

Regulation und Funktion der Metalloproteinase Adamts16 während der Entwicklung von Urogenitalsystem und Epikard

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Diplom-Biologin Charlotte Louise Justine Jacobi

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Stefan Hecht, Ph.D.

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Peter-Michael Kloetzel
 2. Prof. Dr. rer. nat. Harald Saumweber
 3. Prof. Dr. med. Holger Scholz

Tag der mündlichen Prüfung: 20.02.2014

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG	1
1.1 Der Wilms-Tumor Transkriptionsfaktor	1
1.1.1 WT1-bedingte Krankheitsbilder im Menschen	1
1.1.2 Das Wilms tumor 1-Gen <i>WT1</i> und sein Genprodukt.....	1
1.1.3 Übersicht über die WT1-Expression während der Embryogenese und im adulten Organismus.....	2
1.1.4 Wt1 in der Nierenentwicklung	3
1.1.5 Wt1 in der Gonadenentwicklung.....	5
1.2 Metalloproteinasen der extrazellulären Matrix und ihr Vertreter ADAMTS16.....	9
1.2.1 Systematische Einordnung der ADAMTSs.....	9
1.2.2 MMPs, ADAMs und ADAMTSs – Beispiele ihrer Funktionen und physiologischen Relevanz	9
1.2.3 ADAMTS16	12
2 FRAGESTELLUNG	15
3 MATERIAL UND METHODEN	16
3.1 Zell- und Organkulturtechniken	16
3.1.1 Kultivierung von Zelllinien	16
3.1.2 Kryokonservierung von Zellen.....	17
3.1.3 Primäre Organkulturen	17
3.1.4 RNA-Interferenz mittels siRNA (Zellkultur) und Vivo-Morpholino-Knockdown (primäre Organkultur).....	18
3.1.5 Transiente Transfektion.....	19
3.2 Molekularbiologische Techniken	19
3.2.1 Klonierung.....	19
3.2.2 Plasmidpräparation, Kontrollrestriktion und Stammhaltung.....	21
3.2.3 RNA-Extraktion	21
3.2.4 DNA-Extraktion	22
3.2.5 Reverse Transkription.....	22
3.2.6 Konventionelle PCR.....	22
3.2.7 Quantitative RT-PCR	24
3.2.8 Reportergenassay.....	25

3.2.9 Proteinextraktion	25
3.2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	25
3.2.11 Elektromobilitäts-Shift-Assay (EMSA)	27
3.2.12 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP).....	28
3.2.13 Immunhistochemie	29
3.2.14 <i>in vitro</i> Transkription und <i>in situ</i> Hybridisierung.....	31
3.3 <i>in silico</i> Sequenzanalyse	32
3.4 Statistik	32
3.5 Puffer und Lösungen	32
4 ERGEBNISSE	35
4.1 Identifikation des <i>Adamts16</i> -Gens als bisher unbekanntes Wt1-Zielgen.....	35
4.2 Wt1-abhängige Transkription des <i>Adamts16</i> -Gens in verschiedenen Zelllinien	35
4.2.1 Murine M15-Zellen	35
4.2.2 Humane 293-Zellen	36
4.2.3 Humane Osteosarkomzellen.....	37
4.3 Renale <i>Adamts16</i> -Lokalisation und Nachweis einer Koexpression mit Wt1	39
4.3.1 Adulte Niere	39
4.3.2 Embryonale Niere.....	40
4.4 Regulatorischer Einfluss eines Wt1-Knockdowns auf die <i>Adamts16</i> -Expression in embryonalen Nierenkulturen	42
4.5 Funktionelle Rolle von <i>Adamts16</i> in der murinen embryonalen Niere.....	43
4.6 <i>Adamts16</i> -Lokalisation und Nachweis einer Koexpression mit Wt1 in murinen Gonaden.....	45
4.6.1 Adulter Testis	45
4.6.2 Adultes Ovar.....	47
4.6.3 Embryonaler Testis.....	48
4.6.4 Embryonales Ovar	50
4.7 Wt1-abhängige <i>Adamts16</i> -Expression in embryonalen Gonaden.....	51
4.7.1 <i>Adamts16</i> -Expression in <i>Wt1</i> ^{+/+} -, <i>Wt1</i> ^{+/-} - und <i>Wt1</i> ^{-/-} -Mausgonaden.....	52
4.7.2 Regulatorischer Einfluss eines Wt1-Knockdowns auf die <i>Adamts16</i> -Expression in murinen embryonalen XY- und XX-Gonadenkulturen.....	52
4.8 <i>Adamts16</i> -Lokalisation und Nachweis einer Koexpression mit Wt1 im murinen Herz	55

4.9 Molekulare Interaktion des Wilms-Tumor Transkriptionsfaktors mit dem <i>Adamts16</i> -Gen	56
4.9.1 Identifikation dreier Wt1-Konsensussequenzen vor dem <i>Adamts16</i> -Translationsstart <i>in silico</i>	57
4.9.2 Stimulation des <i>Adamts16</i> -Promotors durch Wt1(-KTS)	57
4.9.3 Bindung von rekombinantem Wt1-Protein an die identifizierten Wt1-Bindungsstellen im <i>Adamts16</i> -Gen <i>in vitro</i>	59
4.9.4 Bindung von Wt1 an die <i>Adamts16</i> -Promotor/5'UTR-Region <i>in vivo</i>	61
5 DISKUSSION	64
5.1 Molekulare Voraussetzungen für eine Regulation der <i>Adamts16</i> -Expression durch den Wilms-Tumor Transkriptionsfaktor	64
5.1.1 Wt1(-KTS) interagiert <i>in vitro</i> mit drei Bindungsmotiven im <i>Adamts16</i> -Gen ..	64
5.1.2 Wt1(-KTS) bindet <i>in vivo</i> an das <i>Adamts16</i> -Gen	65
5.1.3 Vollständige <i>in vitro</i> Promotoraktivierung benötigt alle drei Wt1(-KTS)-Bindungsstellen	66
5.2 Wt1-abhängige <i>Adamts16</i> -Expression und mögliche Funktionen von Adamts16 in Urogenitalsystem und Epikard	66
5.2.1 Die Metalloproteinase Adamts16 als entwicklungsrelevanter Faktor in der embryonalen Niere und ihre mögliche Funktion in der adulten Niere	66
5.2.2 Geschlechtsspezifische und entwicklungsabhängige Expressionsregulation von <i>Adamts16</i> durch Wt1 in embryonalen Gonaden	68
5.2.3 Adamts16 in der Spermatogenese	70
5.2.4 Adamts16 als mögliches Element der Follikulogenese und Vaskulogenese	72
6 ZUSAMMENFASSUNG	75
7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	77
8 LITERATURVERZEICHNIS	79
9 DANKSAGUNG	93
10 PUBLIKATIONSLISTE	94
11 EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	95

1 EINLEITUNG

1.1 Der Wilms-Tumor Transkriptionsfaktor

Das Zinkfingerprotein Wilms tumor 1 (WT1) wurde ursprünglich als ein Tumor-Suppressor identifiziert, wobei es unter diesen eine besondere Rolle einnimmt, da WT1 als Wilms-Tumor Transkriptionsfaktor für die normale Embryonalentwicklung benötigt wird.

1.1.1 WT1-bedingte Krankheitsbilder im Menschen

Der Wilms-Tumor (Nephroblastom) ist ein maligner, kindlicher Tumor, der mit einer Inzidenz von 1:10.000 zu den am häufigsten im Kindesalter vorkommenden Nierentumoren zählt (1). Wilms-Tumoren treten zumeist sporadisch und unilateral auf, wobei lediglich 1-2 % familiär bedingt sind (2). In etwa 15 % der Fälle lässt sich ein Nephroblastom auf Mutationen im *WT1*-Gen zurückführen (3), die mit weiteren Defekten assoziiert sein können. Hierzu gehören u.a. das WAGR-Syndrom, welches durch das Auftreten von Wilms-Tumor, Aniridie, urogenitalen Fehlbildungen und geistiger Retardierung gekennzeichnet ist (4-6), das Denys-Drash-Syndrom, das u.a. durch Pseudohermaphroditismus, Wilms-Tumor und Mesangiosklerose charakterisiert ist (7) und das Frasier-Syndrom, das zur Entstehung eines männlichen Pseudohermaphroditismus und einer Glomerulopathie führt (8-10).

1.1.2 Das Wilms tumor 1-Gen *WT1* und sein Genprodukt

Das humane *WT1*-Gen ist auf dem Chromosom 11 (11p13) lokalisiert und erstreckt sich über etwa 50 kb, welche insgesamt zehn Exons beinhalten (11-13). Aus dem Vorhandensein mehrere Startcodons und Prozessen wie dem alternativen Spleißen und der RNA-Editierung resultieren unterschiedliche Wt1-Isoformen. Die zusätzlichen Startcodons CTG und ATG befinden sich neben dem an Position +1 befindlichen ATG an den Positionen -219 (CTG) und +378 (ATG) (14). Von den theoretisch möglichen 36 Protein-Isoformen sind im humanen Organismus lediglich acht und in der Maus sechs Transkripte Protein-kodierend (15).

Die letzten vier Exons kodieren für die charakteristischen vier Zinkfinger des WT1-Proteins vom Typ Cys₂-His₂, welche die Bindung von WT1 an besonders im Promotorbereich vorkommende Bindungsmotive ermöglichen (16). Der Wilms-Tumor

Transkriptionsfaktor besitzt mehrere Konsensus-Sequenzen für die Zielgen-DNA, die sich durch ihren GC- oder TC-Reichtum auszeichnen (5'-GNGNGGGNG-3' (17); 5'-GCGTGGGACT-3' (18); 5'-TCC-3'-Wiederholungen (19). In Abhängigkeit des Zielgens kann der Wilms-Tumor Transkriptionsfaktor dessen Expression aktivieren oder reprimieren, wobei dies beispielsweise aus einer Interaktion des WT1 mit verschiedenen Kofaktoren resultieren kann (6). Die Mehrzahl der bislang identifizierten WT1-Zielgene kodiert für Transkriptionsfaktoren, Zelladhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, sowie für Zellzyklus- bzw. Apoptoseregulatoren (20).

Circa 80 % aller WT1-Proteine weisen zwischen dem dritten und vierten Zinkfinger als Spleißinsertion die drei Aminosäuren Lysin (K), Threonin (T) und Serin (S) auf (21). Diese Insertion führt zu einer sterischen Konformationsänderung in der DNA-Bindungsdomäne (22), die die verminderte DNA-Affinität der sogenannten WT1(+KTS)-Isoform und gleichzeitig deren erhöhte RNA-Affinität bedingt (21, 23). Die WT1(+KTS)-Isoform wurde mit Elementen des Spleißosoms kolokalisiert, was auf eine mögliche regulatorische Rolle bei der RNA-Prozessierung hindeutet (20).

1.1.3 Übersicht über die WT1-Expression während der Embryogenese und im adulten Organismus

Neben seiner Funktion als Tumor-Suppressor spielt der Wilms-Tumor Transkriptionsfaktor eine essentielle Rolle bei der normalen Embryogenese (24, 25). Die erste embryonale *Wt1*-Expression konnte in Mäusen zum Zeitpunkt 8,5 d.p.c. (dies post conceptionem) im intermediären Mesoderm bzw. dem daran angrenzenden lateralen Mesoderm nachgewiesen werden (26). WT1 ist an der Differenzierung verschiedener Organe und Gewebe wie z.B. Gonaden, Nieren und Nebennieren (27, 28), Leber, Milz (29), Epikard (27) und Retina (30) beteiligt, besonders dann, wenn eine Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) oder eine Mesenchymal-epitheliale Transition (MET) auftreten (31). Mausmutanten mit einem homozygot inaktivierten *Wt1*-Gen (*Wt1*^{-/-}) zeigen einen embryonal letalen Phänotyp und weisen charakteristische Defekte beispielsweise innerhalb des Urogenitalsystems und des Herzens auf (6, 20, 27, 28). Da eine Nierenagenesie nicht zwangsläufig zu einem intrauterinen Absterben des Embryos führen würde, ist die embryonale Letalität wahrscheinlich auf eine Hypoplasie des Myokards zurückzuführen (32).

Generell sind es vergleichsweise wenige Zellen, die WT1 im adulten Organismus exprimieren. Dazu gehören die glomerulären Podozyten, wenige Knochenmarkszellen und einige Mesothelzellen (33). Eine erst kürzlich erstmalig durchgeführte Untersuchung an

adulten, Tamoxifen-induzierten *Wt1*-Knockoutmäusen ließ erkennen, dass *Wt1* im adulten Organismus sowohl in der Niere als auch im Pankreas, einem rein adulten Expressionsort, essentiell für die jeweilige Funktion des Organs ist (33).

1.1.4 *Wt1* in der Nierenentwicklung

Während der Nierenentwicklung (34) entsteht zunächst im intermediären Mesoderm des Halsbereichs die Vorniere (Pronephros) und kaudal daran anschließend die Urnieren (Mesonephros) (Abb. 1A) (35, 36). Diese bildet vorübergehend funktionstüchtige Nephrone aus, die in den aus der Vornierenanlage gebildeten Urnierengang (Wolff-Gang) münden. Es kommt zeitnah zu einer schrittweisen Rückbildung der ersten beiden Nierengenerationen, währenddessen sich kaudal der Urnieren die Nachnieren (Metanephros) entwickelt. Diese bildet später die definitive Niere. Durch ein Signal des den Urnierengang umgebenden Mesenchyms an das Ureterepithel kommt es zur Einsprossung der Ureterknospe in das mesenchymale Gewebe (Abb. 1A). Dieses beginnt in unmittelbarer Nähe zur Ureterknospe zu kondensieren, wobei an der Spitze der Ureterknospe eine Kappe entsteht. Das nun als metanephrogenes Blastem bezeichnete, kondensierte Mesenchym bewirkt im Zuge einer gegenseitigen Induktion die schrittweise Verzweigung der Ureterknospe. Diese wiederum initiiert die weitere Kondensierung des die Kappe umgebenden metanephrogenen Blastems zu Nierenbläschen (Abb. 1B) und deren anschließende, auf einer MET beruhenden Differenzierung (37). Obwohl bei der initialen Differenzierung des metanephrogenen Blastems nur eine schwache *Wt1*-Expression messbar ist, die erst mit dem Beginn der MET des metanephrogenen Blastems erheblich ansteigt (26), wird *Wt1* bereits für die Bildung der Ureterknospe benötigt. Eine homozygote Inaktivierung von *Wt1* in Mäusen hat eine Degeneration der Zellen des den Urnierengang umgebenden Mesenchyms durch Apoptose zur Folge und die Bildung der Ureterknospe bleibt aus (27).

Mit Hilfe von Organkulturen und RNA-Interferenz-Experimenten konnte sowohl bei der initialen Ausbildung der Ureterknospe als auch bei der späteren MET die essentielle Rolle von *Wt1* in der Nierenentwicklung belegt werden (27, 38-40). Beispielsweise konnten das Amphiregulin-Gen, welches zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren gehört, und das wingless-related MMTV integration site 4-Gen (*Wnt4*) als *Wt1*-Zielgene identifiziert werden (41). Amphiregulin stimuliert die Ausknospung epithelialer Gewebe in Nierenkulturen und ist wahrscheinlich eines der Signale zwischen der *Wt1*-Expression und der einwachsenden Ureterknospe (42). Das *Wnt4*-Protein hingegen ist essentiell für die

MET. In *Wnt4*^{-/-}-Mäusen werden die mesenchymalen Zellen zwar zu einer MET angeregt, die der Bildung epithelialer Strukturen vorangehende Kondensation der mesenchymalen Zellen zu Zellhaufen, den Vorstufen der Nierenbläschen, bleibt jedoch aus (41).

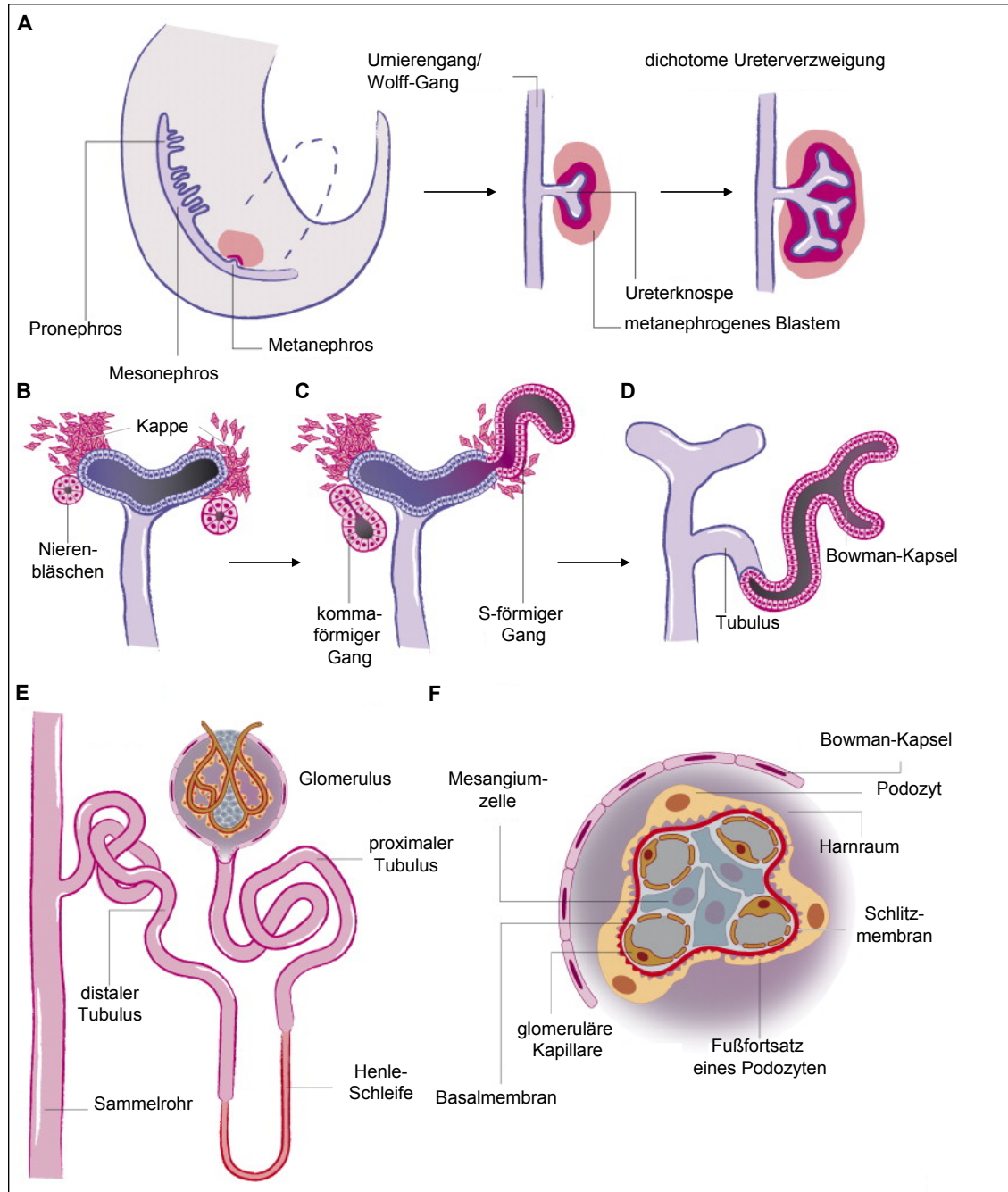


Abbildung 1: Schema der embryonalen Nierenentwicklung. A: Gezeigt ist die räumliche Lage der drei Nierengenerationen mit einer schematischen Darstellung der dichotom verzweigenden Ureterknospe im metanephrogenen Blastem. B-D: Dargestellt ist die schrittweise Differenzierung des metanephrogenen Blastems und des Ureters zum Tubulussystem. E: Schematische Zeichnung eines Nephrons; F: Schematische Zeichnung eines angeschnittenen Glomerulus (Nach Uhlenhaut *et al.* (43))

In der weiteren Nierenentwicklung nimmt jedes Nierenbläschen zunächst eine kommaförmige Gestalt an und differenziert dann zu einem S-förmigen Gang (Abb. 1C). Zu diesem Zeitpunkt erreicht die *Wt1*-Expression im proximalen Bereich der S-förmigen Gänge ihr Maximum (25). Die u.a. aus diesem Bereich entstehenden glomerulären Podozyten bilden in der adulten Niere den alleinigen Expressionsort von *Wt1* (44). Die aus den zahlreichen, sich verlängernden S-förmigen Gängen entstehenden Tubuli, an deren proximalen Enden die Glomeruli differenzieren, gewinnen Anschluss an den aussprossenden Ureter (Abb. 1D). In der adulten Niere gelangt das Filtrat über das Tubulussystem in die Sammelrohre (Abb. 1E), und wird von dort über die ebenfalls aus der ursprünglichen Ureterknospe differenzierten Nierenkelche und das Nierenbecken in den Ureter geleitet.

Auch im adulten Organismus ist *Wt1* für die normale Nierenfunktion erforderlich (33). Die glomerulären Podozyten sind mit ihren ineinander verzahnten Fußfortsätzen für die Ausbildung des Schlitzdiaphragmas verantwortlich, welches als wesentlicher Bestandteil der glomerulären Filtrationsbarriere fungiert (Abb. 1F) (44). Bei einer verminderten *Wt1*-Expression kommt es zu Defekten im Schlitzdiaphragma, die zumeist eine Proteinurie zur Folge haben (33, 45).

1.1.5 *Wt1* in der Gonadenentwicklung

Neben der Nierenentwicklung verläuft auch die Differenzierung der embryonalen Gonaden abhängig vom Wilms-Tumor Transkriptionsfaktor (46). Die vielfältigen Funktionen von *WT1* sind bisher jedoch nur partiell bekannt. Die Analyse von *Wt1*^{-/-}-Mäusen zeigt deutlich, dass die Gonadenanlagen bei einer fehlenden *Wt1*-Expression bereits vor der Geschlechtsdifferenzierung durch Apoptose degradieren (27).

Bevor es in der normalen Embryonalentwicklung zu einer Geschlechtsdeterminierung kommt, befindet sich bei beiden Geschlechtern eine indifferente Genitalleiste medial der Urnierenleiste. Diese Genitalleiste weist eine geschlechtsunabhängige, homogene *Wt1*-Expression auf (47), wobei *Wt1* für einen korrekten Ablauf der genetisch gesteuerten Determination des Geschlechts benötigt wird. In männlichen Gonaden aktiviert *Wt1* beispielsweise die Expression des Sex determining region of Y-Gens (*Sry*), welches über weitere Signalwege, mitunter über die Differenzierung der Sertoli-Zellen (40), die Maskulinisierung der Genitalleiste einleitet (48).

In der Entwicklung der männlichen Gonade bilden sich aus Zellen der Genitalleiste und den aus der Dottersackwand eingewanderten Urkeimzellen die primären Keimstränge (49).

Diese wandern tiefer in das Zentrum der Gonadenanlage ein und bilden dort die Hodenstränge, die wiederum die Vorläufer der Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi) sind. Innerhalb der Hodenstränge differenzieren sich die Sertoli-Zellen und zwischen den Hodensträngen die Leydig-Zwischenzellen. Während dieser Differenzierungsprozesse wird Wt1 vermehrt innerhalb der Hodenstränge in den Sertoli-Zellen bzw. deren Vorläufern exprimiert (47). Im weiteren Entwicklungsverlauf teilen sich die primären Keimzellen mitotisch, so dass Präspmatogonien entstehen, die mit dem Eintreten in die Geschlechtsreife zu Spermatogonien reifen. Nach neuesten Erkenntnissen wird murines Wt1 neben den Sertoli-Zellen auch in den männlichen Urkeimzellen direkt nach der Einwanderung in die Gonadenanlage und in den daraus resultierenden embryonalen Präspmatogonien exprimiert. Welche Funktion Wt1 dort hat, ist bisher jedoch unklar (50, 51).

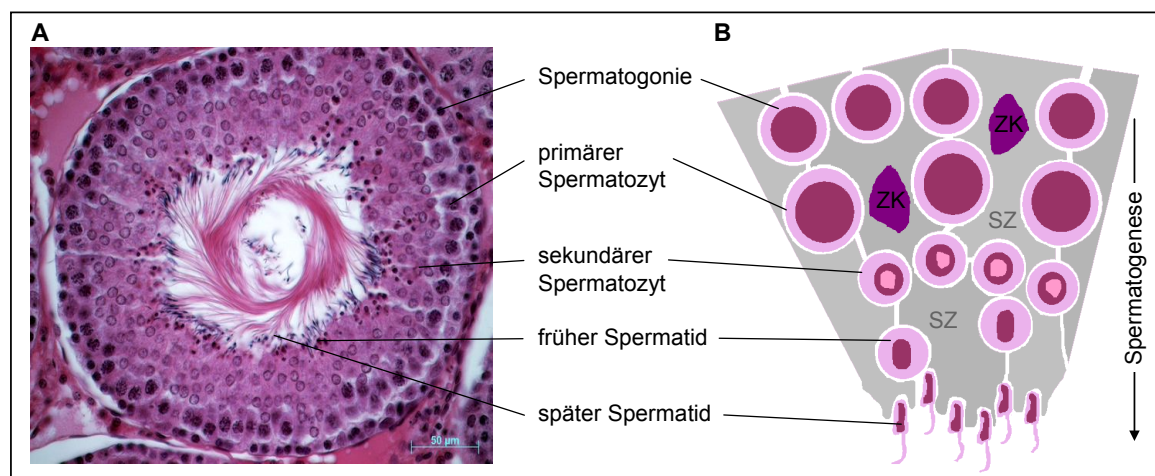


Abbildung 2: Beispiel eines ausdifferenzierten Hodenkanälchens mit einer schematischen Darstellung der verschiedenen Keimzellstadien der Spermatogenese. A: Dargestellt ist ein adultes Hodenkanälchen (Bildquelle: PD Dr. Jakob Walter (CC BY-NC 3.0 DE)). B: Gezeigt ist ein schematischer Ausschnitt eines Hodenkanälchens mit den Keimzellstadien während der Spermatogenese. Außenrand des Hodenkanälchens (oben); Lumen des Hodenkanälchens (unten); Sertoli-Zelle (SZ); Zellkern der Sertoli-Zelle (ZK)

Während der Spermatogenese im adulten Organismus differenzieren die am äußeren Rand der Tubuli seminiferi gelegenen Spermatogonien zu Spermatozyten und diese wiederum zu Spermatisiden. Dabei wandern die Keimzellen schrittweise in das Innere des Hodenkanälchens, in dessen Lumen sich die reifen Spermien befinden. Im Laufe der Spermatogenese erkennt man deutliche morphologische Veränderungen der Keimzellen, die besonders in den Kernen sichtbar werden. Der zunächst große, runde Kern der Spermatogonien unterscheidet sich deutlich vom länglichen, stark kondensierten Kern der

Spermatiden, was eine Einordnung der einzelnen Zellen in die verschiedenen Stadien der Spermatogenese erleichtert (Abb. 2). Die *Wt1*-Expression im adulten Testis ist nach bisherigem Wissensstand auf die Sertoli-Zellen beschränkt (52). Diese sind im adulten Testis wichtige Produzenten von Hormonen und Wachstumsfaktoren, die für die Versorgung der Keimzellen und die normale Funktion der Gonaden benötigt werden. In adulten Mäusen konnte nach einer gezielten, gewebsspezifischen Abschaltung der *Wt1*-Expression in Sertoli-Zellen ein Absterben der Keimzellen und eine daraus resultierende Sterilität beobachtet werden (53).

Wt1 kann nicht nur durch die *Sry*-Aktivierung die Differenzierung der männlichen Gonadenanlage initiieren, sondern auch durch die Aktivierung des Wnt4-Signalwegs die Differenzierung der weiblichen Gonadenanlage anregen (40). Wie in der männlichen Gonadenentwicklung kommt es auch in der weiblichen Gonadenanlage zunächst zur Bildung von primären Keimsträngen (49). Nachdem diese jedoch im tiefergelegenen Mesenchym als Markstränge zu Grunde gegangen sind, bilden sich sekundäre Keimstränge, die im oberflächlichen Mesenchym der Gonadenanlage verbleiben. Diese sogenannten Rindenstränge zerfallen zu kleineren Zellhaufen, die jeweils eine oder mehrere aus der Dottersackwand eingewanderte Urkeimzellen umschließen und die Eiballen bilden. Die weibliche embryonale Gonade ist zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zur männlichen morphologisch weniger differenziert und weist eine homogene *Wt1*-Expression in den somatischen Zellen auf (47). Im weiteren Entwicklungsverlauf gehen die Urkeimzellen in eine Proliferationsphase über und werden nun als Oogonien bezeichnet. Diese teilen sich mitotisch, und nach einer Größenzunahme bilden die resultierenden Oozyten zusammen mit einer sie umgebenden Schicht von Follikelepithelzellen die Primordialfollikel.

Im adulten Organismus differenzieren pro Zyklus mehrere Primordialfollikel zu sprungreifen Graaf-Follikeln, wobei sie dabei verschiedene Entwicklungsstadien (Primärfollikel, Sekundärfollikel, Tertiärfollikel) durchlaufen (Abb. 3A). Im Verlauf des Reifungsprozesses kommt es zu einer deutlichen Größenzunahme der Follikel, da die Granulosazellen des Follikelepithels eine mehrschichtige Hülle bilden und gleichzeitig innerhalb des Follikels eine Höhle (Antrum folliculi) entsteht (Abb. 3B). Die Oozyte verbleibt dabei randständig im Eihügel, der aus der Granulosazellschicht nach innen wächst. Kommt es zum Eisprung, löst sich der gesamte Eihügel von der Follikelinnenwand und die Oozyte kann aus dem Ovar freigesetzt werden.

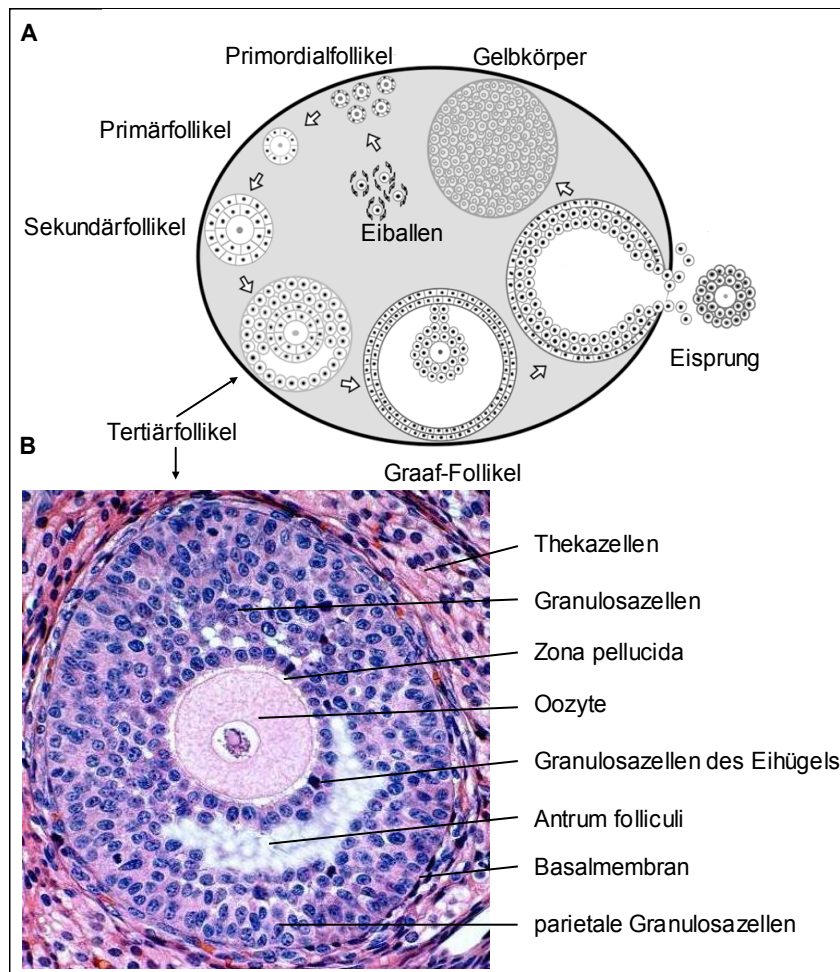


Abbildung 3: Schematische Abbildung eines Ovars mit den verschiedenen Stadien der Follikulogenese und eine Erläuterung des Aufbaus eines Follikels am Beispiel einer histologischen Färbung eines Tertiärfollikels. A: Dargestellt ist der schematische Ablauf der Follikulogenese vom Primordialfollikel bis hin zum Eisprung. Zusätzlich eingezeichnet sind die embryonalen Eiballen mit den Urkeimzellen. Bildquelle: Hawkins *et al.* (54). B: Erläuterung der follikulären Zelltypen am Beispiel eines Tertiärfollikels. Die Eizelle ist von Granulosazellen umschlossen, die den Eihügel bilden. Bildquelle: PD Dr. Jakob Walter (CC BY-NC 3.0 DE)

Im adulten Ovar ist *Wt1* deutlich umschriebener lokalisiert als im embryonalen Ovar, da seine Expression auf die periovarialen Epithelzellen und die follikulären Granulosazellen beschränkt ist (52). Mit zunehmender Follikelreife verringert sich jedoch die *Wt1*-Expression in den Granulosazellen (55). Vermutlich wirkt *Wt1* bei der hormonellen Zyklusregulation mit, zumal das Follikelstimulierende Hormon (FSH) die *Wt1*-Expression in Granulosazellen hemmt (56).

Neben der Entwicklung der Gonaden ist *Wt1* auch an der Entstehung der Genitalwege beteiligt. Im männlichen Organismus entsteht aus dem Wolff-Gang u.a. der Samenkanal, wohingegen im weiblichen Organismus aus dem parallel zum Wolff-Gang verlaufenden Müller-Gang der Eileiter wird. In der männlichen Entwicklung steuert *Wt1* das Anti-

Müller Hormon Rezeptor 2-Gen (*Amhr2*), dessen Aktivierung die Rückbildung des Müller-Gangs zur Folge hat (57). In Übereinstimmung mit diesem Regulationsmechanismus und der Steuerung des *Sry*-Gens wird bei männlichen Tieren mit heterozygoten *Wtl*-Keimbahnmutationen eine Geschlechtsumkehr bzw. eine abnorme Ausbildung der Geschlechtsorgane beobachtet (52).

1.2 Metalloproteinasen der extrazellulären Matrix und ihr Vertreter ADAMTS16

1.2.1 Systematische Einordnung der ADAMTSs

Die A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs (ADAMTS)-Proteine sind sezernierte Metalloproteinasen, die sowohl von Säugetieren als auch von Invertebraten exprimiert werden (58). Die ADAMTSs gehören als Subfamilie der Adamalysine zur Metalloendopeptidase Familie M12 (59). Diese beinhaltet neutrale Zink-Metallopeptidasen, die in ihrer katalytisch aktiven Metalloproteinase-Domäne über ein gebundenes Zinkion verfügen und kovalente Peptidbindungen hydrolytisch spalten können (60). Zu den Adamalysinen zählen neben der ADAMTS-Subfamilie auch die A Disintegrin And Metalloproteinase (ADAM)-Subfamilie und die Snake Venom Metalloproteinase (SVMP)-Subfamilie. Diese Einordnung basiert auf Analogien der Domänenstrukturen, im Fall der ADAMTSs auf der starken Ähnlichkeit ihrer Metalloproteinase-Domäne zu der der SVMPs. Eine weitere Einteilungsmöglichkeit der Metalloproteinasen, unabhängig von ihrer tertiären Proteinstruktur, ist die Zuordnung anhand der metallbindenden Aminosäurereste. Die Adamalysine werden diesbezüglich den Metzinkinen zugeordnet, die sich durch drei metallbindende Histidinreste auszeichnen. Ein weiterer, wichtiger Vertreter der Metzinkine ist die Familie M10, der die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) angehören (59). Sie sind die am längsten bekannten Metalloproteinasen der extrazellulären Matrix (EZM) und derzeit am besten funktionell und regulatorisch charakterisiert.

1.2.2 MMPs, ADAMs und ADAMTSs – Beispiele ihrer Funktionen und physiologischen Relevanz

Die Gelatinase A (MMP2) wurde als erste humane MMP 1979 von Sopata *et al.* (61) aus menschlichen Leukozyten isoliert und charakterisiert. Aktuell sind 25 humane MMPs bekannt, die in der Lage sind, wesentliche Bestandteile der EZM zu spalten (62). Die

Mehrheit der MMPs wird in die EZM sezerniert, einige bleiben jedoch membrangebunden. Die MMPs degradieren extrazelluläre Faserstrukturen oder setzen extrazellulär gebundener Moleküle frei. Sie sind damit ein integraler Bestandteil gewebespezifischer Umbauprozesse wie z.B. Wundheilung (63), Knochenbildung (64), altersbedingte Involution (65) und Embryonalentwicklung (64, 66). Durch eine verminderte Enzymaktivität kann es zu schwerwiegenden pathologischen Zuständen kommen, die mit einer chronischen Entzündungsreaktion oder einer krankhaft veränderten Gewebestruktur einhergehen (67). Hierzu zählen u.a. rheumatoide Arthritis (68, 69), Multiple Sklerose (70) oder Leberfibrose (71). In annähernd allen Tumoren lassen sich MMPs nachweisen, wobei man von einer Rolle bei der Förderung des Tumorwachstums, der Tumordinvasion und der Metastasenbildung ausgeht (62).

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist die MMP9 (Gelatinase B) von besonderem Interesse, da sie momentan den einzigen bekannten Vertreter der Metzinkine darstellt, der durch den Wilms-Tumor Transkriptionsfaktor reguliert wird (72). Marcet-Palacios *et al.* (72) konnten zeigen, dass in Epithelzellen der Lunge die Regulation des *MMP9*-Gens über die Proteinkinase A mit Hilfe eines WT1-vermittelten Signalwegs stattfindet, wobei WT1 im Normalzustand als ständiger Repressor der *MMP9*-Expression fungiert (72).

Die Entdeckung der Adams begann Anfang der 90er Jahre mit der Isolation von Adam1 und Adam2 aus dem Sperma eines Meerschweinchens (73, 74). Inzwischen sind über 40 verschiedene Adams in diversen Organismen bekannt, wobei 25 davon aus humanen Geweben isoliert werden konnten (75). Im Unterschied zum Menschen kodiert das Genom der Maus für 37, das der Ratte für 34 *Adam*-Gene (76). Sowohl die Funktion als auch die Regulation der Adams sind bisher nur bruchstückhaft erforscht (76, 77).

ADAMS sind transmembrane Proteine, die seltener eine Rolle bei der Spaltung von extrazellulären Faserstrukturen spielen, sondern weitaus wichtiger bei der Prozessierung von Oberflächenrezeptoren, Signalmolekülen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen sind. ADAMS werden beispielsweise für die Muskelentwicklung, Befruchtung oder Immunantwort benötigt (78, 79). Nicht alle humanen ADAMS sind proteolytisch aktiv; mindestens acht Kandidaten sind stattdessen an Vorgängen wie Zellmigration und Zelladhäsion, beispielsweise bei der Entstehung von Zell-Zell-Kontakten, beteiligt (77).

Die wahrscheinlich größte Aufmerksamkeit haben bisher auf Grund ihrer extensiven Expression die *Adam*-Gene im murinen Testis bekommen (76). Dazu zählen auch die bereits erwähnten Gene *Adam1* und *Adam2*, deren Genprodukte eine Funktion bei der Bindung des Spermiums an die Eizelle haben (80, 81). Adam1 ist jedoch nicht essentiell

für die Sperma-Eizell-Bindung, da *Adam1*^{-/-}-Mäuse zwar infertil sind, ihre Spermien jedoch *in vitro* mit einer Rate von etwa 50 % im Vergleich zu Sperma aus Wildtyp-Mäusen an Eizellen binden können (81). Neben der *Adam1*^{-/-}-Maus ist auch die *Adam3*^{-/-}-Maus infertil, da die Migration des Spermiums durch den Eileiter verhindert wird (82).

Wie die MMPs sind auch die ADAMs an der Ausbildung einer Reihe von teilweise schwerwiegenden Krankheiten beteiligt. Hierzu gehören z.B. Gelenkentzündungen (83), Alzheimer (84), allergische Reaktionen (85), Multiple Sklerose (86), Diabetes (87) und Asthma (88). Ferner wird auch von einer Beteiligung der ADAMs an der Karzinogenese, z.B. im Zusammenhang mit Pankreas- (89), Brust- (90, 91), Darm- (92) oder Prostatakarzinomen (93), ausgegangen. Hierbei spielt in erster Linie nicht der Ab- bzw. Umbau von EZM-Komponenten die wichtigste Rolle, sondern vielmehr steuern die ADAMs beispielsweise die Tumorzell-Adhäsion (94). ADAM10 etwa wird mit der Spaltung von neuronalem, endothelialem und vaskulär-endothelialem Cadherin (N-, E-, VE-Cadherin) assoziiert, welche wiederum wichtig für die Adhäsion oder die Migration von Tumorzellen sind (95-97). Die Regulation einer ADAM durch WT1 konnte bisher nicht beschrieben werden.

Die erste ADAMTS (ADAMTS1) wurde 1997 von Kuno *et al.* (98) charakterisiert, wobei die Zahl der mittlerweile identifizierten humanen *ADAMTS*-Gene auf 19 gestiegen ist. Phylogenetisch lassen sie sich vor allem anhand von Sequenzhomologien aber auch durch ihre Substratspezifität in sieben Gruppen einteilen. ADAMTS16 bildet auf Grund einer gesamten Sequenzhomologie von 57 % und einer Sequenzhomologie der katalytischen Metalloproteinase-Domäne von 85 % gemeinsam mit ADAMTS18 die Gruppe V (58, 99). In ihrer Domänenstruktur ähneln die ADAMTSs den ADAMs, sie grenzen sich jedoch durch das Vorhandensein einer oder mehrerer charakteristischer Thrombospondin-Motive und dem Fehlen einer Transmembrandomäne von diesen ab (98). Generell gilt für die ADAMTSs nachstehende Domänenabfolge: Signalpeptid, Prodomäne, Metalloproteinase-Domäne mit katalytischem Zink-Atom, Disintegrin-Domäne, zentrale Thrombospondin Typ1-Domäne, Cystein-reiche Domäne, Spacer-Region und zumeist mehrere C-terminale Thrombospondin-Motive. Letztere variieren in ihrer Anzahl zwischen null (ADAMTS4) und 14 (ADAMTS9), wobei ADAMTS16 drei Thrombospondin-Motive besitzt (99-102). ADAMTSs werden als Zymogene synthetisiert und nach einer N-terminalen Prozessierung in die extrazelluläre Umgebung sezerniert. Noch innerhalb der Zelle werden sowohl die für die Transportinformationen kodierende Signalsequenz als auch die Prodomäne, zumeist mit Hilfe einer Furin-Convertase, abgespalten. Im Zuge der Prodomänen-Abspaltung, die

für eine korrekte Proteinfaltung und die Sekretion verantwortlich ist, kommt es zur Aktivierung der katalytisch tätigen Metalloproteinase-Domäne (103-105). Außerhalb der Zelle liegen die ADAMTSs zumeist ungebunden vor, wobei einige Vertreter wahrscheinlich mit Hilfe der zentralen Thrombospondin Typ1-Domäne eine Interaktion mit Komponenten der EZM eingehen können (106, 107). Sie wirken dort u.a. als Kollagenasen und Aggrecanasen, aber auch andere Proteoglycane der EZM wie Versikan und Brevikan können proteolytisch gespalten werden (102, 108, 109). Im Speziellen kommen Aufgaben bei der Angiogeneseinhibition, der Homoeostase der Blutgerinnung und der Entzündungsantwort hinzu (110, 111). Das Funktionsspektrum ist breit gefächert, denn auch für die Embryonalentwicklung und die Fortpflanzung sind ADAMTSs auf Grund ihrer Rolle beim Gewebeumbau und -abbau essentiell (112-114). *Adamts1* wird beispielsweise von den follikulären Granulosazellen sezerniert und ist für die Umstrukturierung der EZM während der Follikelreifung erforderlich. In *Adamts1*^{-/-}-Mäusen konnte eine deutlich reduzierte Fertilität auf Grund einer stark zurückgegangenen Ovulationsrate festgestellt werden. Die genaue Funktion von *Adamts1* ist bisher jedoch unklar (115).

Einige Mutationen in *ADAMTS*-Genen können zu schwerwiegenden Krankheiten wie der Thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura führen. In ihrem Fall wird der Abbau des Von-Willebrand-Faktors, dem Trägermolekül des Blutgerinnungsfaktors VIII, durch Mutationen im *Adamts13*-Gen verhindert, so dass es zu multiplen Thromben kommt (116). Durch den proteolytischen Abbau extrazellulärer Matrixbestandteile begünstigen ADAMTSs zudem die lokale Zellinvasion und können dadurch ein infiltrierendes Tumorstadium fördern (117). Bis heute sind bei weitem noch nicht alle Funktionen oder Substrate für die bisher identifizierten ADAMTSs bekannt.

1.2.3 ADAMTS16

Im Zuge einer computerbasierten Suche nach DNA-Contigs des humanen Genoms, die für Metalloproteinase-Domänen bzw. Thrombospondin Typ1-Domänen kodieren, wurde 2002 die Entdeckung von sieben neuen ADAMTSs, darunter auch ADAMTS16 (GenBank accession number: AJ315734), publiziert. Innerhalb des humanen Genoms wurde es auf dem langen Arm des Chromosom fünf (5p15) lokalisiert (58). Zunächst konnte *ADAMTS16* mittels PCR vor allem in fetalen Geweben wie der Lunge und der Niere, sowie im adulten Gehirn und im adulten Ovar lokalisiert werden (58). Mittlerweile wurde es zudem im Pankreas (118) und im Rückenmark (119), sowie im Knorpel und in Gelenkflüssigkeiten (120, 121) nachgewiesen.

Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Arthrose im Vergleich zu gesunden Probanden ein signifikant erhöhtes Niveau an ADAMTS16 im Knorpel und in der Gelenkflüssigkeit aufweisen (121). Mitunter wird ADAMTS16 auch mit Morbus Dupuytren in Verbindung gebracht, einer vor allem in den Handinnenflächen auftretenden, benignen Bindegewebserkrankung, bei der ein erhöhtes Niveau an ADAMTS16 in der Hohlhandsehne festgestellt werden kann (122). Auch karzinogene Plattenepithelzellen des Ösophagus zeigen einen solchen Anstieg in der *ADAMTS16*-Expression (119). In einer kürzlich publizierten tierexperimentellen Untersuchung wurde *Adamts16* zudem als ein Kandidateng für eine erbliche Form der arteriellen Hypertonie beschrieben. Multiple Varianten des *ADAMTS16*-Gens wurden beim Menschen mit familiären Hypertonieerkrankungen in Verbindung gebracht (123).

Während zunehmend mehr Informationen über die möglichen Funktionen von ADAMTS16 bekannt werden, sowohl bezogen auf die normale Entwicklung als auch auf den Krankheitsfall, ist bisher nur sehr wenig über die molekularen Mechanismen zur Regulation der gewebespezifischen Expression oder die Substratspezifität von ADAMTS16 bekannt.

Durch PCR-Experimente konnte eine *Adamts16*-Expression im Ovar besonders in den parietalen Granulosazellen von präovulatorischen Follikeln festgestellt werden, wobei in luteinisierten Granulosazellen ein Anstieg von der *Adamts16*-Expression nach der Zugabe von FSH und Forskolin beobachtet wurde. Dies führte zu der Annahme, dass eine Expressionsregulation über den zyklischen AMP-Weg erfolgt (118). Die von Surridge *et al.* (124) untersuchten Chondrosarkomzellen waren nach einer *ADAMTS16*-Überexpression größer und länger und wiesen sowohl eine geringere Proliferation als auch eine verringerte Migration auf. Zudem konnte als Folge der *ADAMTS16*-Überexpression eine Reduktion der MMP13 festgestellt werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass der transforming growth factor, beta 1 (TGF β) die endogene *ADAMTS16*-Expression dosisabhängig induziert. Die regulatorischen Zusammenhänge oder funktionellen Interaktionen von ADAMTS16 und MMP13 bzw. TGF β sind bislang nicht genauer beschrieben (124). Stattdessen konnten Surridge *et al.* (124) nach einer *Adamts16*-Promotoranalyse sowohl specificity protein 1 (Sp1)- als auch early growth response 1 (Egr1)-Konsensussequenzen identifizieren und durch Kotransfektionen eine Aktivierung des *Adamts16*-Promotors durch beide Transkriptionsfaktoren belegen. Ob Egr1 und Sp1 *in vivo* an den *Adamts16*-Promotor binden und eine physiologisch relevante Rolle spielen, ist bislang jedoch unklar.

Als mögliches Substrat konnte bisher *in vitro* α 2-Makroglobulin nachgewiesen werden, welches *in vivo* in hoher Konzentration in der Follikelflüssigkeit vorhanden ist (118). Des Weiteren wurde eine schwache Aggrekanaseaktivität festgestellt (125), die jedoch in Versuchen zur *in vitro* Chondrogenese nicht bestätigt werden konnte (126).

Die molekularen Mechanismen, welche für die gewebespezifische Expression von ADAMTS16 verantwortlich sind sowie die Funktion dieses Proteins wurden bislang nicht hinreichend untersucht. Von einer Kenntnis dieser Zusammenhänge sind wichtige Einblicke in die normale Gewebedifferenzierung sowie in diverse Krankheitsprozesse zu erwarten.

2 FRAGESTELLUNG

Die Auswertung einer DNA-Microarray-Analyse mit einer Mesonephroszelllinie ergab, dass die Expression des *Adamts16*-Gens nach einem *Wt1*-Knockdown signifikant abgeschwächt wurde. Im Rahmen meiner Doktorarbeit sollte die Frage geklärt werden, ob es sich bei *Adamts16* um ein neues Zielgen des Wilms-Tumor Transkriptionsfaktors handelt. Weiterhin sollte gegebenenfalls der molekulare Mechanismus der Interaktion von *Wt1* mit dem *Adamts16*-Gen analysiert werden. Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand darin, die funktionelle Bedeutung einer *Wt1*-regulierten *Adamts16*-Expression zu charakterisieren.

Die Realisierung des Forschungsvorhabens sollte in folgenden Etappen angestrebt werden:

Teilprojekt 1: In verschiedenen Zelllinien sollte zunächst überprüft werden, ob zwischen der Expression von *Wt1* und *Adamts16* eine Korrelation besteht.

Teilprojekt 2: Weiterhin sollte die Lokalisation von *Adamts16* in Geweben unterschiedlicher embryonaler Entwicklungsstadien und im adulten Organismus mit histochemischen Methoden untersucht werden. Insbesondere sollte überprüft werden, ob und gegebenenfalls in welchen Zellen *Adamts16* und *Wt1* koexprimiert werden.

Teilprojekt 3: Des Weiteren sollte mit der Hilfe von embryonalen Organkulturen untersucht werden, ob *Wt1* für die normale Expression des *Adamts16*-Gens notwendig ist.

Teilprojekt 4: Die Organkulturen sollten auch dazu benutzt werden, die Auswirkungen eines *Adamts16*-Knockdowns auf die *ex vivo* Differenzierung zu ermitteln.

Teilprojekt 5: Schließlich sollte untersucht werden, ob der Wilms-Tumor Transkriptionsfaktor an den Promotor des *Adamts16*-Gens bindet und diesen aktiviert.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zell- und Organkulturtechniken

3.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und die zugehörigen Bezugsquellen sind in der nachfolgenden Tab.1 aufgeführt.

Tabelle 1: Beschreibung und Bezugsquellen der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Ursprung/ Beschreibung	Bezugsquelle
293	humane embryonale Nierenzellen (127)	Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
COV434	humane Ovarialkarzinomzellen aus einem soliden primären Granulosazelltumor (128)	Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann, Institut für Physiologie, Universitätsklinikum Lübeck
M15	Mesonephroszellen der Maus (20)	Prof. Dr. Christoph Englert, Leibniz Institut für Altersforschung, Fritz Lipmann Institut, Jena
UB27	humane Osteosarkomzellen abstammend von U2OS-Zellen; stabil transfiziert mit einem Wt1(-KTS)-Expressionsplasmid (129)	Prof. Dr. Christoph Englert, Leibniz Institut für Altersforschung, Fritz Lipmann Institut, Jena
UD28	humane Osteosarkomzellen abstammend von U2OS-Zellen; stabil transfiziert mit einem Wt1(+KTS)-Expressionsplasmid (129)	Prof. Dr. Christoph Englert, Leibniz Institut für Altersforschung, Fritz Lipmann Institut, Jena

Alle Zelllinien wurden in Kunststoffzellkulturschalen (TPP, Trasadingen) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 21 % O₂ und 5 % CO₂ in einem CB150 Inkubator (Binder, Tuttlingen) kultiviert. Die humanen Ovarialkarzinomzellen COV434, die humane embryonale Nierenzelllinie 293 und die murine Mesonephroszelllinie M15 wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) „high glucose“ (PAA Laboratories, Cölbe) kultiviert, wobei dem Medium zusätzlich 2 mmol/l L-Glutamin (PAA Laboratories) und 10 % fetales Kälberserum (FKS) (Biochrom KG, Berlin) beigefügt wurden. Die humanen Osteosarkomzelllinien UB27 und UD28 wurden gleichermaßen kultiviert, wobei dem

Medium zusätzlich 1 µg/ml Tetrazyklin (PAA Laboratories) beigefügt wurde, um die durch den Tetrazyklin-abhängigen Promoter gesteuerte Wt1-Produktion zu unterdrücken. Für eine Induktion der Wt1-Expression wurde das Tetrazyklin aus dem Kulturmedium entfernt und die Zellen wurden für weitere 72 h ohne eine Passage kultiviert. Alle Zelllinien wurden regelmäßig alle 2-4 Tage nach einer mikroskopischen Begutachtung (Axiovert 35, Zeiss, Jena) der Zelldichte und der Zellmorphologie passagiert, wobei die gewünschte Zellmenge nach dem Ablösen in frischem Medium aufgenommen wurde. Für das Ablösen der Monolayerkulturen von den Zellkulturschalen wurde für die COV434-Zellen Accutase verwendet, wohingegen alle anderen Zellen trypsiniert wurden (beides PAA Laboratories). Alle Zelllinien wurden regelmäßig mit Hilfe des VenorGeM® Kits (Minerva Biolabs, Berlin), der AmpliTaq® DNA Polymerase (Invitrogen, Darmstadt) und dem dazugehörigen 5 x-Puffer nach Herstellerangaben auf einen Mykoplasmenbefall untersucht, um eine experimentelle Verwendung kontaminierter Zelllinien auszuschließen.

3.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Erhaltung der Originalzelllinien wurden von der initialen Kulturschale, sobald es die Zellzahl erlaubte, mehrere Kryoröhrchen mit der für eine neue Aussaat gewünschten Zellmenge bei -196 °C in flüssigem Stickstoff eingelagert. Hierfür wurden die Zellen von der Zellkulturschale abgelöst, 5 min bei 135 g abzentrifugiert und in Gefriermedium aufgenommen. Zum langsamen Einfrieren wurde ein mit Isopropanol gefüllter Nalgene™ Cryo -1 °C Freezing Container (Nalgene, Rochester (USA)) verwendet, der bei -80 °C eine Abkühlrate von 1 °C/min aufweist. Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen zügig auf 37 °C erwärmt, die Zellen in frischem Medium aufgenommen, durch zweimaliges Abzentrifugieren und Resuspendieren in frischem Medium gewaschen und dann in Kultur aufgenommen.

3.1.3 Primäre Organkulturen

Für die Kultivierung der embryonalen Organe wurden terminiert verpaarten C57BL/6J-Mäusen die Embryonen zum gewünschten Zeitpunkt entnommen und bis zur Organentnahme am selben Tag in sterilem 1 x PBS bei 4 °C gelagert. Die Nieren und Gonaden eines Embryos wurden nach der Entnahme jeweils auf separaten Polyethylen Terephthalat Transwell®-Filtern (Corning, Berlin) mit einer Porengröße von 0,4 µm kultiviert. Die Kultivierung auf getrennten Filtern ermöglichte einen gezielten Vergleich der gleichen Organe eines Individuums nach einer Vivo-Morpholino-Behandlung. Die

Transwell®-Filter wurden unter regelmäßigem Mediumwechsel in DMEM „High Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine“ (PAA Laboratories, Cölbe), versetzt mit 10 % FKS (Biochrom KG, Berlin), 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories), bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert.

Zum Erlangen einer primären Epikardzellkultur wurden den Embryonen der terminiert verpaarten C57BL/6J-Mäuse die Herzen entnommen und diese für fünf Tage auf 96-Loch Platten (0,385 cm² pro Loch) bei regelmäßigem Mediumwechsel in DMEM „High Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine“, versetzt mit 10 % FKS, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Dies erlaubte das Auswachsen der Epikardzellen als Monolayer auf der Kunststoffplatte, so dass nach dem Entfernen des Myokards nach fünf Tagen eine überwiegend aus Epikardzellen bestehende Primärkultur zurückblieb. Diese konnte anhand der typischen Kopfsteinpflaster-ähnlichen Morphologie und der stabilen Wt1-Expression identifiziert werden. Die primären Epikardzellen wurden nach der Myokardentfernung bei gleichbleibenden Bedingungen weiter kultiviert bzw. mit Vivo-Morpholinos behandelt (s. Kap. 3.1.4).

3.1.4 RNA-Interferenz mittels siRNA (Zellkultur) und Vivo-Morpholino-Knockdown (primäre Organkultur)

Für den Knockdown von *Wt1* in M15-Zellen wurden diese bis zu einer Konfluenz von 60 % in 6-Loch-Schalen (9,6 cm² pro Loch) kultiviert. Die Transfektion mit einem Pool aus vier verschiedenen siRNAs (Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, Bonn) gegen das murine *Wt1*-Gen (ON-TARGETplus, SMARTpool siRNA, L-040686-01-0005, NM_144783) erfolgte mit Hilfe des Transfektionsreagenzes DharmaFECT 1 reagent (Dharmacon) nach Herstellerprotokoll, wobei pro Loch 50 pmol der siRNA eingesetzt wurden. Als Negativkontrolle wurden vier verschiedene *non-targeting* siRNAs (siGENOME Non-targeting siRNA Pool #2, Dharmacon) transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen für die RNA- bzw. Proteinpräparation verwendet (s. Kap. 3.2.3 und 3.2.9).

Der Knockdown von Wt1 in *ex vivo* Organkulturen bzw. primären Epikardzellen wurde durch eine 72-stündige Inkubation mit Wt1 (5'-CAGGTCCCGCACGTCGGAACCCATG-3') oder mismatch (5'-CAGCTCCGGCACCTCGCAACCGATG-3') Vivo-Morpholinos (Gene Tools, Philomath (USA)) erzielt (130), wobei pro Loch 10 µM Vivo-Morpholinos direkt in das jeweilige Kulturmedium gegeben wurden. Der Knockdown von Adams16 in

ex vivo Nierenkulturen erfolgte entsprechend des Wt1-Knockdowns unter Verwendung von Adamts16 (5'-CGCAGCACAACTCGGGACTCCATG-3') bzw. mismatch Vivo-Morpholinos (5'-CGGAGCAGAACGTCGGCACTCGATG-3') (Gene Tools). Die Gesamtzelllysate bzw. die totale RNA wurden wie in Kap. 3.2.3 und 3.2.9 beschrieben präpariert. Die Effizienz aller RNA-Interferenz-Experimente wurde mittels Western Blot geprüft (s. Kap. 3.2.10).

3.1.5 Transiente Transfektion

Für die Transfektion von 293-Zellen wurden diese in 6-Loch Platten ausgesät und nach ca. 20 h bei einer Konfluenz von etwa 40 % transfiziert. Hierfür wurden pro Loch 100 µl Medium (ohne Zusätze) mit 300 ng Plasmid-DNA und 1,3 µl FuGENE6 (Roche, Mannheim) gemischt, für 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und für 48 h auf die mit frischem Medium versehenen Zellen gegeben.

Die COV434-Zellen wurden in 24-Loch Schalen ausgesät, so dass am Folgetag eine Konfluenz von 40 % erreicht war. Für eine Transfektion wurden pro Loch 200 ng Promotor-Reporter-Expressionsplasmid, 100 ng Renilla-Luziferase-Plasmid, 200 ng Wt1(-KTS)-Expressionsplasmid und 4 µl FuGENE6 in 100 µl Medium für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Gemisch auf die Zellen gegeben und diese für 24 h kultiviert. Die Inkubation aller transfizierten Zellen erfolgte bei 37 °C, 21 % O₂ und 5 % CO₂. Die verwendeten Plasmide und ggf. ihre Herstellung werden in Kap. 3.2.1 erläutert.

3.2 Molekularbiologische Techniken

3.2.1 Klonierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind, inklusive der verwendeten Vektoren, Matrizen und Restriktionsenzyme (REN), in der Tabelle 2 aufgelistet. Zum Öffnen und Dephosphorylieren des Zielvektors in einem 20 µl-Ansatz wurden 5 µg Plasmid mit 1 FDU der jeweils benötigten FastDigest[®] REN und 1 U der FastAP[™] Thermosensitive Alkaline Phosphatase (alle Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und der Restriktionsansatz für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion bei 65 °C erfolgte die Auftrennung in einem 1 % Agarosegel in 0,5 x TBE-Puffer bei 10-14 V/cm. Die anschließende DNA-Extraktion wurde mit Hilfe des QIAquick[®] Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Plasmide und Vektoren. Die Plasmide bzw. Vektoren sind alphabetisch geordnet. Eigene Arbeit (EA); Laborsammlung (LS)

Plasmid/ Vektor	Matrize	REN	Quelle	Verwendung
pBACe3.6-mAdamts16 Klon: RPCIB731I01114Q	-	-	imaGenes, Berlin	Matrize für PCR
pBluescript II KS(+)	-	-	Fermentas	Klonierungsvektor
pBluescript IIS(+)-S mAdamts16 ISH-Sonde	pGL3b-mAdamts16 Prom V1/R1	<i>Bam</i> HI; <i>Hind</i> III	EA	Template für IVT
pBluescript IIS(+)-AS mAdamts16 ISH-Sonde	pGL3b-mAdamts16 Prom V1/R1	<i>Bam</i> HI; <i>Hind</i> III	EA	Template für IVT
pCB6 ⁺	-	-	Invitrogen	Klonierungsvektor, Leervektor in 293-Zellen und bei Reporter-genassay
pCB6 ⁺ mWT1-C130	-	-	LS	Wt1(-KTS)-Expression in 293- und COV434- Zellen
pCB6 ⁺ mWT1-C132	-	-	LS	Wt1(+KTS)-Expression in 293- und COV434- Zellen
pCRII	-	-	Invitrogen	Klonierungsvektor
pCRII- S/AS rAdamts16 ISH-Sonde	cDNA Ratteniere	-	EA	Template für IVT
pGL3b	-	-	Promega	Klonierungsvektor
pGL3b-mAdamts16 Prom V1/R1	pBACe3.6- mAdamts16	<i>Sac</i> I; <i>Hind</i> III	EA	Promotor-Reporter- Konstrukt (-3000)
pGL3b-mAdamts16 Prom V2/R1	pGL3b-mAdamts16 Prom V1/R1	<i>Sac</i> I; <i>Hind</i> III	EA	Promotor-Reporter- Konstrukt (-26)
pGL3b-mAdamts16 Prom V3/R1	pGL3b-mAdamts16 Prom F1/R1	<i>Sac</i> I; <i>Hind</i> III	EA	Promotor-Reporter- Konstrukt (+65)
pGL3b-mAdamts16 Prom V4/R1	pGL3b-mAdamts16 Prom V1/R1	<i>Sac</i> I; <i>Hind</i> III	EA	Promotor-Reporter- Konstrukt (+101)
phRL-CMV	-	-	Promega	Renilla-Luziferase- Plasmid

Für die Herstellung der DNA-Inserts wurde im Normalfall das Expand Long Template PCR System (Roche, Mannheim) mit Puffer 1 und den PCR-Programmen Nr. 1 oder 2 verwendet (s. Kap. 3.2.6). Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem Agarosegel erfolgte die Gelextraktion durch das QIAquick[®] Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben. Die Restriktion der PCR-Fragmente wurde in einem 50 µl-Ansatz unter der Verwendung der passenden FastDigest[®] REN wie bereits beschrieben ausgeführt. Die Ligation des fertigen PCR-Fragments mit dem vorbereiteten Vektor (Verhältnis (v/v): 3:1) wurde mit Hilfe des LigaFast[™] Rapid DNA Ligation Systems (Promega, Mannheim) in einem 10 µl-Ansatz für 5 min bei RT durchgeführt. Etwa 20 µl One Shot[®] TOP10

Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, Darmstadt) wurden mit der Hälfte des Ligationsansatzes versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und 45 sek auf 42 °C erhitzt. Danach wurden 300 µl S.O.C. Medium (Invitrogen) hinzugegeben und die Kultur eine Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden zur Selektion auf Antibiotika-haltigen LB-Agar-Platten ausplattiert. Die weitere Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Als Kontrolle diente die Religation des Vektors ohne ein inseriertes Fragment.

Die Herstellung des Plasmids für die *in vitro* Transkription der Ratten-RNA-Sonden wurde mir Hilfe einer TA-Klonierung unter der Verwendung des TA-Cloning[®] Kit (Invitrogen) durchgeführt. Für die Herstellung des DNA-Inserts wurde die AmpliTaq[®] DNA Polymerase (Invitrogen) und das PCR-Programm Nr. 3 (s. Kap. 3.2.6, Tab. 3) verwendet.

3.2.2 Plasmidpräparation, Kontrollrestriktion und Stammhaltung

Die auf Selektionsagarplatten gewachsenen Bakterienkolonien wurden einzeln gepickt und in Antibiotika-haltigem LB-Medium über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Für die Plasmidpräparation aus der gesättigten Kultur wurde der NucleoSpin[®] Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben verwendet, wobei in ultraPURE-Wasser (Millipore, Darmstadt) eluiert wurde. Zur Kontrolle der selektierten Klone erfolgte ein Restriktionsverdau mit den geeigneten FastDigest[®] REN nach Herstellerangaben (Promega, Mannheim). Danach wurde die DNA auf einem 1 % Agarosegel in 0,5 x TBE-Puffer bei 10-14 V/cm aufgetrennt und begutachtet. Die positiven Klone wurden zur Überprüfung der Sequenzidentität bei der Firma Eurofins MWG (Ebersberg) sequenziert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde der Nano Drop[™] 2000 (peQLab) nach Herstellerangaben verwendet. Die Plasmide wurden bei 4 °C gelagert.

Für die bakterielle Stammhaltung von Plasmid-haltigen *E. coli*-Zellen wurden 700 µl einer gesättigten Bakterienkultur mit 700 µl Gefriermedium vermischt und in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.2.3 RNA-Extraktion

Für die Präparation der Total-RNA aus 293-, UB27- und UD28-Zellen wurde zunächst das Medium der Kulturen entfernt, die Zellen mit TRIzol[®] LS Reagent (Invitrogen, Darmstadt) lysiert und dann eine Präparation nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe des Nano Drop[™] 2000 (peQLab, Erlangen) durchgeführt.

Die Isolation der Total-RNA aus siRNA-behandelten M15-Zellen, Vivo-Morpholino-behandelten Kulturen und embryonalen Organen heterozygoter *Wtl*^{-/-}-Mäuse erfolgte mit Hilfe des RNeasy[®] Micro Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Bei den Vivo-Morpholino-Proben wurden keine Konzentrationsbestimmungen durchgeführt. Auf Grund der geringen Ausbeute und der vergleichbaren Ausgangsgewebemengen wurde die gesamte RNA direkt für die cDNA-Umschreibung verwendet (s. Kap. 3.2.5). Die Proben wurden bei -80 °C gelagert.

3.2.4 DNA-Extraktion

Für die Genotypisierung bzw. Geschlechtsbestimmung von Embryonen wurde von jedem präparierten Embryo die Schwanzspitze in 100 µl PBND-Puffer für 3 h bei 55 °C unter schütteln lysiert. Nach 5-minütigem Erhitzen auf 95 °C wurden die Lysate kurz abzentrifugiert und 2 µl des Überstandes in einer PCR eingesetzt (s. Kap. 3.2.6).

3.2.5 Reverse Transkription

Die Erststrang-cDNA-Synthese aus RNA-Proben wurde mit der Superscript II Reverse Transkriptase (Invitrogen, Darmstadt) nach Herstellerangaben mit Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen) durchgeführt. Für einen 20 µl-Ansatz wurden 2 µg Total-RNA eingesetzt. Bei den Proben der Vivo-Morpholino-Versuche wurde die gesamte RNA ohne eine Konzentrationsbestimmung eingesetzt. In den quantitativen PCR-Experimenten erfolgte ein Abgleich mit dem jeweiligen Housekeeping-Gen.

3.2.6 Konventionelle PCR

Für einen 20 µl Standard-Ansatz wurde das Expand Long Template PCR System von Roche (Mannheim) unter dem Einsatz von 1 µl cDNA, 1/5 Vol 5 x-Puffer 1, 350 nM Primer, 350 nM dNTP's und 1,4 U Polymerase-Mix verwendet.

Die Geschlechtsbestimmung der Embryonen erfolgte mit Hilfe der AmpliTaq[®] DNA Polymerase (Invitrogen, Darmstadt) und die Genotypisierung mit Hilfe der Phusion[®] High Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich (GB)) jeweils nach Herstellerangaben.

Eine Übersicht über die verwendeten PCR-Programme gibt die Tabelle 3, wobei die Elongationszeiten jeweils nach den Herstellerangaben an die Fragmentgrößen angepasst wurden. Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotidprimer (Eurofins MWG, Ebersberg) sind in der Tabelle 4 aufgeführt. Für alle konventionellen PCR-Amplifikationen wurde ein UNO-Thermoblock (Biometra, Göttingen) verwendet.

Tabelle 3: Verwendete PCR-Programme für die konventionelle und quantitative PCR.

Nr.	Polymerase	Anwendung	Annealing	Elongation	Zyklen
1	Polymerase-Mix	Klonierung	60 °C/ 30 sek	68 °C/ 60sek- 120 sek	40
2	Polymerase-Mix	Klonierung Maus ISH-Sonden	55 °C/ 13 sek	68 °C/60 sek	35
3	AmpliTa [®]	Klonierung Ratte ISH-Sonden	55 °C/ 30 sek	68 °C/60 sek	34
4	Phusion [®]	Geschlechtsbestimmung	55 °C/ 30 sek	72 °C/30 sek	38
5	AmpliTa [®]	Genotypisierung	54 °C/ 30 sek	68 °C/30 sek	34
6	SYBR [®] Green	RT-PCR allgemein	60 °C/ 60 sek	77 °C/ 30 sek	45
7	SYBR [®] Green	RT-PCR ChIP humane Primer	60 °C/ 60 sek	81 °C/ 30 sek	45

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotidprimer für konventionelle und quantitative PCR.

Name/ Zielgen	Sequenz
<i>Klonierung</i>	
mAdamts16-Prom-V1/R1	5'-CGTGAGCTCAATTCAGACCTTTGCATA-3' 5'-CGTAAGCTTCCGAGGGCTCACAGGACT-3'
mAdamts16-Prom-V2/R1	5'-GTAGAGCTCCCTTTGCCCTCCCTAGTCCT-3' 5'-CGTAAGCTTCCGAGGGCTCACAGGACT-3'
mAdamts16-Prom-V3/R1	5'-ATAGAGCTCCACTGCCACTCCACCTCCC-3' 5'-CGTAAGCTTCCGAGGGCTCACAGGACT-3'
mAdamts16-Prom-V4/R1	5'-ATAGAGCTCCTGCCGGGTCGGTCCTTTG-3' 5'-CGTAAGCTTCCGAGGGCTCACAGGACT-3'
rAdamts16-Ratte-ISH-Sonde-V/R	5'-AGAGACGGTCTCTGTGAGAG-3' 5'-GCAAATACACAGTGCAAGTG-3'
mAdamts16-Maus-S-ISH-Sonde-V/R	5'-CCTGGATCCTCCTTCTCTACCCTCCTCCC-3' 5'-CCTAAGCTTTCACAGGACTCAGCTCAGCA-3'
mAdamts16-Maus-AS-ISH-Sonde-V/R	5'-CCTAAGCTTTCCTTCTCTACCCTCCTCCC-3' 5'-CCTGGATCCTCACAGGACTCAGCTCAGCA-3'
<i>quantitative RT-PCR</i>	
mAdamts16-V/R	5'-TTTCCACCAGAAGAGAACTG-3' 5'-GGTGATCATCAGGACTTCG-3'
hADAMTS16-V/R	5'-TGGCTTTATTGTGCAGACG-3' 5'-GCCTCTTCTGTTCTGTATCAT-3'
mGapdh-V/R	5'-ACGACCCCTTCATTGACCTCA-3' 5'-TTTGGCTCCACCCTTCAAGTG-3'
hGAPDH-V/R	5'-ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3' 5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'
<i>Geschlechtsbestimmung</i>	
mKdm5d-V/R	5'-CTGAAGCTTTTGGCTTTGAG-3' 5'-CCACTGCCAAATTCTTTGG-3'
<i>Genotypisierung</i>	
mWtl Ko A	5'-CTACCGGTGGATGTGGAATGTGT-3'
mWtl Ko B	5'-TCCCGAACAATTTACCTTGAATC-3'
mWtl Ko C	5'-AGCCTAACTTTGGGGCTTATCTCC-3'

Name/ Zielgen	Sequenz
<i>ChIP</i>	
mAdamts16-PromBS-V/R	5'-GTCATAGGCGTGAAGGATGC-3' 5'-CCATGCACATCAGAGTTATC-3'
mAktin-ChIP-V/R	5'-ATAGGACTCCCTTCTATGAGC-3' 5'-TCCAAGTAGACCTACTGTGCA-3'
mAmhr2-PromBS-V/R	5'-CAGCTGGACAGCCAAGGTC-3' 5'-CAGCCAAGGCTTCCTACAAA-3'
hADAMTS16-PromBS-V/R	5'-TGCTCTTTGTCCCTGCACTCTC-3' 5'-CGCTCCGAGGGGCTAGGGGC-3'
hAKTIN-ChIP-V/R	5'-GTGAGTGGCCCGCTAACCT-3' 5'-CCTTGTCACACGAGCCAG-3'

3.2.7 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR wurden mit Hilfe der StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Apparatur unter der Verwendung von MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plates und MicroAmp® Optical Adhesive Film (alles Life Technologies GmbH, Darmstadt) durchgeführt. Pro 10 µl-Standard-Ansatz wurden 2 µl cDNA (1:10 verdünnt, Vivo-Morpholino-Proben unverdünnt), 50 nM Primer und ½ Vol 2 x SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies GmbH) eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotidprimer sind in der Tabelle 4 (Kap. 3.2.6) aufgelistet. Es wurden generell Doppelbestimmungen durchgeführt und eine Negativkontrolle mit destilliertem Wasser (Gibco, Darmstadt) anstelle der cDNA. Die verwendeten PCR-Programme sind der Tabelle 3 (Kap. 3.2.6) zu entnehmen. Im Anschluss an jede Real-time RT-PCR erfolgte eine Bestimmung der Schmelzkurve zur Überprüfung der Produktidentität. Hierfür wurde zwischen 60 °C und 95 °C alle 15 sek die Temperatur um 0,3 °C erhöht und die Fluoreszenzintensität gemessen. Es wurden nur solche Messungen zur Auswertung herangezogen, deren Negativkontrollen einen Cycle threshold (Ct)-Wert von 45 aufwiesen, und bei denen gleichzeitig korrekte Schmelzkurven der zu messenden Proben vorhanden waren.

Die relativen Transkriptionslevel wurden durch die Subtraktion des *Gapdh* Ct-Wertes von dem jeweils korrespondierenden Ct-Wert des zu untersuchenden Gens errechnet (=ΔCt). Die Unterschiede in den DNA-Mengen wurden dann durch die Formel $2^{\Delta\Delta Ct}$ ermittelt.

Für die Auswertung der ChIP-Experimente wurde von einem Input von 100 % ausgegangen. Durch die Subtraktion des ΔCt_(Input)-Wertes von den ΔCt-Werten der übrigen Messungen und einem anschließendem Potenzieren des Faktors 2 wurde die prozentuale DNA-Anreicherung jeder Probe im Vergleich zum Input ermittelt. Der prozentuale Anteil

der unter dem Einsatz von Serum präzipitierten Probe wurde dann als 1-fache Anreicherung definiert und alle übrigen Werte im Verhältnis dazu dargestellt.

3.2.8 Reportergenassay

Die COV434-Zellen wurden in einer 24-Loch Platte kultiviert (s. Kap. 3.1.1) und transfiziert (s. Kap. 3.1.5). Nach 24 h erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS (PAA Laboratories, Cölbe) eine Frier-Tau-Lysis mit Hilfe des Passive Lysis Buffer (100 µl/Loch) und dem Dual Glo[®] Luciferase Assay System von Promega (Mannheim). Zur Messung der relativen Luziferaseaktivität wurde das Microlite TLX 1 Luminometer (MGM Instruments, Hamden (USA)) verwendet. In 5 ml Röhrchen (75 x 12 mm, Sarstedt, Nümbrecht) wurde mit 30 µl Lysat zunächst die Firefly-Luziferaseaktivität und dann die Renilla-Luziferaseaktivität für jeweils 10 x 2 sek gemessen. Die Summe der zehn gemessenen Werte wurde als endgültiger Messwert definiert. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Für die Auswertung wurde in jeder Probe die Firefly-Luziferaseaktivität durch die Renilla-Luziferaseaktivität dividiert. Die Renilla-Luziferase sollte in allen Proben gleichermaßen exprimiert sein und diente der Normalisierung der Messwerte nach eventuell abweichenden Transfektionseffizienzen. Die relative Luziferaseaktivität der mit dem Leervektor transfizierten Zellen wurden zur besseren Veranschaulichung gleich eins gesetzt und die Messwerte der restlichen Proben entsprechend umgerechnet.

3.2.9 Proteinextraktion

Die Zellen und Gewebeproben wurden für die Proteinextraktion zweimal mit PBS (PAA Laboratories, Cölbe) gewaschen und mit Laemmli-Puffer lysiert, wobei pro Loch etwa 300-400 µl Laemmli-Puffer verwendet wurden. Daraufhin erfolgte ein Ultraschallaufschluss mit Hilfe des Labsonic U (B. Braun, Melsungen) und eine anschließende Denaturierung für 5 min bei 95 °C. Die OD₂₆₀ und OD₂₈₀ wurden mit Hilfe des Spektrophotometers DU[®] 730 (Beckman Coulter, Krefeld) gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Warburg-Christian-Gleichung errechnet. Die Proteinproben wurden bei -20 °C gelagert.

3.2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Für die elektrophoretische Größenauftrennung einzelner Proteine in denaturierten Proteingemischen wurden jeweils 20 µg Proteinprobe mit 0,5 µg Bromphenolblau versetzt,

auf ein 10 % Polyacrylamidgel aufgetragen und mit 11,5-17 V/cm Gellaufstrecke in 1 x SDS-Laufpuffer aufgetrennt (Mini Protean 2 Cell, Bio-Rad Laboratories, München).

Das Übertragen auf eine Polyvinylidendifluorid-Membranen (Immobilon P Tranfer Membrane, GE Healthcare, Freiburg) erfolgte mit einer Trans-Blot[®] SD (Bio-Rad Laboratories) Semidry Apparatur bei konstanten 15 V in 1 x Blottingpuffer. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde die Membran für 60 min bei RT in 5 % Magermilch (in TBST-Puffer) blockiert. Die Inkubation des primären Antikörpers wurde in 2,5 % Magermilch über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Daraufhin wurde die Membran 3 x 15 min mit TBST-Puffer gewaschen und für 1 h mit dem sekundären Antikörper in 2,5 % Magermilch inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Detektion des Peroxidasegekoppelten Zweitantikörpers mit Hilfe des Western Lightning[™] Plus ECL reagents (PerkinElmer, Massachusetts (USA)), wobei für die Belichtung der Hyperfilm[™] MP von Amersham Biosciences (München) verwendet wurde. Zur anschließenden Verifikation einer gleichmäßigen Proteinbeladung wurden die gebundenen Antikörper in einer 10-minütigen Inkubation mit 0,2 N NaOH von der Membran entfernt, diese kurz mit TBST-Puffer gewaschen, erneut in 5 % Magermilch blockiert und mit einem Antikörper gegen Pan-Aktin oder Gapdh inkubiert. Die Tabelle 5 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper.

Tabelle 5: Für Proteinnachweise verwendete primäre und sekundäre Antikörper.

Spezies	Spezifität	Klonalität	Konjugation	Verdünnung	Hersteller/ Bestellnummer
Kaninchen	h/m/rWt1	PAK	-	1:200	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg); sc-192
Maus	h/m/rPan-Aktin	MAK	-	1:6000	Millipore (Darmstadt); MAB1501R
Maus	h/m/rGapdh	MAK	-	1:300	Millipore; MAB374
Kaninchen	h/m/rAdamts16	PAK	-	1:300	Santa Cruz Biotechnology; sc-50490
Esel	Kaninchen-IgG	PAK	HRP	1:20000	Santa Cruz Biotechnology; sc-2313
Esel	Maus-IgG	PAK	HRP	1:30000	Santa Cruz Biotechnology; sc-2005
Esel	Maus-IgG	PAK	HRP	1:30000	Santa Cruz Biotechnology; sc-2306
Esel	Kaninchen-IgG	PAK	HRP	1:20000	Santa Cruz Biotechnology; sc-2305

3.2.11 Elektromobilitäts-Shift-Assay (EMSA)

Die nicht-radioaktiven EMSAs wurden mit rekombinantem, durch GST-Tag gereinigtem Wt1(-KTS)- und Wt1(+KTS)-Protein und doppelsträngigen (ds)Oligonukleotiden (Eurofins MWG, Ebersberg) durchgeführt (s. Tab. 6). Für das murine *Adamts16*-Gen wurden die Oligonukleotide auf der Basis von *in silico* prognostizierten Wt1-Bindungsstellen ausgewählt. Das jeweilige Vorwärts-Oligonukleotid jedes Oligonukleotidpaares wurde mit Hilfe des DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit (Roche, Mannheim) nach Herstellerprotokoll Digoxigenin (DIG)-markiert und durch ein Erhitzen und anschließendes langsames Abkühlen mit dem Rückwärts-Oligonukleotid renaturiert. Auf gleiche Weise wurde zu jedem dsOligonukleotid auch ein selektiv mutiertes, markiertes dsOligonukleotid hergestellt.

Tabelle 6: Name und Sequenz der für die EMSAs verwendeten Oligonukleotide. Die Buchstaben A-C bezeichnen die Wt1-Bindungsstellen im *Adamts16*-Gen, die durch Unterstreichen in den Sequenzen gekennzeichnet sind. Wildtypsequenz (wt); mutierte Sequenz (mut)

Bezeichnung	Sequenzen (oben: Vorwärts-Oligonukleotid; unten: Rückwärts-Oligonukleotid)
mAdamts16EMSA-wtA-V/R	5'-TCCTCTAT <u>CCCCCTCCCCTCTCCT</u> CTCCTTT-3' 5'-AAAGGAGAGGAGAGGGGAGGGGATAGAGGA-3'
mAdamts16EMSA-wtB-V/R	5'-GTGCTTT <u>GCCGCCCCCGCCACCA</u> CTGCCA-3' 5'-TGGCAGTGGTGGCGGGGGCGGCAAAGCAC-3'
mAdamts16EMSA-wtC-V/R	5'-CTGCCA <u>CTCCACCTCCCGGTGCCG</u> AACGAA-3' 5'-TTCGTT <u>CGGCACCGGGAGGTGGAGT</u> GGCAG-3'
mAdamts16EMSA-mutA-V/R	5'-TCCTCTATCGAATTC <u>ACTCTGCT</u> CTCCTTT-3' 5'-AAAGGAGAGTAGAGTGAATTCGATAGAGGA-3'
mAdamts16EMSA-mutB-V/R	5'-GTGCTTTGAAGCTTCACGACATCACTGCCA-3' 5'-TGGCAGTGATGTCGTGAAGCTTCAAAGCAC-3'
mAdamts16EMSA-mutC-V/R	5'-CTGCCA <u>CTCAAGCTTCAGATGACG</u> AACGAA-3' 5'-TTCGTT <u>CGTCATCTGAAGCTTGAGT</u> GGCAG-3'
mNtrk2-wt-V/R	5'-TGTGAACTCCCACATGCTGCTG-3' 5'-CAGCAGCATGTGGGAGTTCACA-3'

In einem 20 µl-Ansatz wurden 1/5 Vol 5 x EMSA-Reaktionspuffer, 1 µg poly[d(I-C)], 0,75 µg rekombinantes Wt1-Protein und 1 pmol des DIG-markierten dsOligonukleotids eingesetzt. Für die Kompetitorversuche wurde zusätzlich wahlweise in 20-fachem, 50-fachem oder 100-fachem Überschuss unmarkiertes dsOligonukleotid des neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2-Gens (*Ntrk2*) mit einer bereits publizierten Wt1(-KTS)-Bindungsstelle verwendet (131). Jeder Ansatz wurde für 1 h bei RT inkubiert und anschließend zum Auftragen auf ein natives 6 % Polyacrylamidgel mit 1/5 Vol 30 %

Glycerin versetzt. Die Ansätze wurden bei 8 V/cm Gellaufstrecke in 0,5 x TBE-Puffer in einer Mini Protean 2 Cell (Bio-Rad Laboratories, München) aufgetrennt.

Der Transfer der DNA-Protein-Komplexe auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Roche) wurde mit Hilfe der Trans-Blot® SD (Bio-Rad Laboratories) Semidry Apparatur für 1 h bei konstanten 0,1 A durchgeführt. Danach erfolgte ein UV-Crosslink mit Hilfe des Stratalinker® UV crosslinker (Stratagene, Waldbronn). Nach einem kurzen Waschen der Membran mit MABT-Puffer wurde diese mit dem Roche Blocking Reagent (1 % in Maleinsäurepuffer) für 30 min bei RT blockiert, und anschließend für weitere 30 min bei RT mit dem anti-DIG-alkaline phosphatase antibody (Roche, Verdünnung: 1:10000) in 1 % Blocking Reagent (in Maleinsäurepuffer) inkubiert. Dann wurde die Membran 2 x 15 min mit MABT-Puffer gewaschen und kurz in Entwicklungspuffer äquilibriert. Die Detektion mit 1:50 NBT/BCIP Stock Solution (Roche) in Entwicklungspuffer erfolgte abgedunkelt über Nacht und wurde durch einen Waschschrift mit TE-Puffer gestoppt.

3.2.12 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Die UB27- und UD28-Zellen wurden für 72 h in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin inkubiert (s. Kap. 3.1.1), um die Expression von Wt1(-KTS) bzw. Wt1(+KTS) zu kontrollieren. Pro Versuchsansatz wurden ca. 4×10^6 Zellen verwendet (Zellzählung in Neubauer Zählkammer mittels Trypanblau), wobei stets Zellen mit Wt1-Induktion und Zellen ohne Wt1-Induktion verglichen wurden. Die Wt1-Überexpression wurde mittels Western Blot kontrolliert. Für eine Protein-DNA-Vernetzung wurden die Zellen mit 1 % Formaldehyd 10 min bei RT fixiert, mit PBS+Complete™ (Roche, Mannheim) gewaschen und 15 min auf Eis mit Lysispuffer+Complete™ lysiert. Zur Fragmentierung der DNA bis zu einer Größe von etwa 300-600 bp erfolgte ein Ultraschallaufschluss (Labsonic U, B. Braun, Melsungen), dessen Effizienz nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer (16000g) mit Hilfe eines 1 % Agarosegels (in 0,5 x TBE-Puffer bei 10-14 V/cm) dokumentiert wurde. Die 1:10 in IP-Puffer+Complete™ verdünnten Proben wurden mit Hilfe von 80 µl/2 ml Protein G Agarose/Salmon Sperm DNA (Millipore, Darmstadt) für 1 h bei 4 °C vorgereinigt (Preclearing). Daraufhin erfolgte die Inkubation mit 0,6 µg Wt1-Antikörper (sc-192, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) pro 2 ml-Ansatz über Nacht bei 4 °C. Als Negativkontrolle diente Kaninchen-IgG (sc-2027, Santa Cruz Biotechnology). Die Immunpräzipitate wurden durch eine einstündige Inkubation bei 4 °C mit Protein G Agarose/Salmon Sperm DNA an die Agaroseperlen gebunden, und nach intensivem Waschen (je 5 min LS-, HS-, Lithium- und TE-Puffer) mit frisch angesetztem

Elutionspuffer bei RT 2 x 15 min eluiert. Die anschließenden DNA-Extraktion wurde nach Herstellerangaben mittels Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) (Invitrogen, Darmstadt) durchgeführt, wobei die DNA schließlich mit 100 % Ethanol präzipitiert wurde. Das DNA-Pellet wurde in ultraPURE-Wasser (PAA Laboratories, Cölbe) gelöst und die Proben bei -20 °C gelagert.

Dieses Protokoll wurde ebenfalls für die M15-Zellen verwendet, wobei hier nur 1×10^6 Zellen pro Ansatz eingesetzt wurden. Es erfolgte keine Wt1-Überexpression sondern, auf Grund des hohen endogenen Wt1-Niveaus, ein Vergleich zwischen den Präzipitationen mit Wt1-Antikörper (sc-192, Santa Cruz Biotechnology), Histon-H3-Antikörper (07-690, Millipore, Darmstadt) und Kaninchen-IgG (sc-2027, Santa Cruz Biotechnology).

Die präzipitierte DNA aller Versuche wurde mit Hilfe von quantitativer RT-PCR amplifiziert (s. Kap. 3.2.7). Dafür wurden die in der in der Tabelle 4 gelisteten ChIP-Primer (s. Kap. 3.2.6) und die in der Tabelle 3 gelisteten RT-PCR-Programme Nr. 6 und 7 verwendet. Die Primer flankierten im Fall des *Adamts16*-Gens die Region, in der die drei Wt1-Bindungsstellen identifiziert werden konnten (vgl. Kap. 4.9.1, Abb. 15).

3.2.13 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden Embryonen terminiert verpaarter C57BL/6J-Mäuse und Wistar-Ratten bzw. die Nieren und Gonaden von adulten C57BL/6J-Mäuse und Wistar-Ratten verwendet. Fast alle Gewebe wurden direkt nach der Entnahme kurz in PBS gewaschen, mit Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn (Niederlande)) eingebettet und bei -80 °C gelagert. Lediglich das adulte Ovar wurde vor dem Einbetten für 20 h in 4 % Paraformaldehyd (in PBS) fixiert und anschließend für 48 h in 20 % Succrose (in PBS) entwässert.

Mit einem Kryostat (CM1900; Leica Microsystems, Wetzlar) wurden 7 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, auf Superfrost® Plus Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) aufgebracht und bei -80 °C gelagert. Vor dem Färben wurden die Schnitte kurz bei RT getrocknet, für 10 min bei -20 °C mit Aceton:Methanol (3:2) fixiert, kurz in PBS gewaschen und für 5 min mit Protein Block Serum-Free (Dako, Hamburg) blockiert.

Die für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper sind der Tabelle 7 zu entnehmen. Die Verwendung des jeweiligen Serum-Proteins diente als Negativkontrolle. Die Verdünnung aller Antikörper erfolgte in antibody diluent (Zymed Laboratories Inc., Berlin). Die Schnitte wurden für 1 h bei RT mit dem jeweiligen Primär-Antikörper

inkubiert, 10 min in PBS gewaschen und danach für 30 min bei RT mit dem jeweils zugehörigen, Fluoreszenz-konjugierten Sekundär-Antikörper inkubiert. Nach 10-minütigem Waschen wurden die Zellkerne für 5 min mit 15 ng/μl DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) (Invitrogen, Darmstadt) angefärbt. Nach dem abschließenden Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit Vectashield® Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame (USA)) eingedeckelt und die Immunfluoreszenz mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops (DM 2500) und der LAS AF Lite Software (Leica Microsystems, Wetzlar) bzw. dem Axioplan S100 Lichtmikroskop von Zeiss (Jena) und der Metamorph V4.1.2 Software (Visitron Systems, Puchheim) dokumentiert. Für die Wt1-Immunfärbungen auf Mausgewebeschnitten wurde der Wt1-Antikörper mit der Bestellnummer ab140484 verwendet und für Rattengewebeschnitte der Wt1-Antikörper mit der Bestellnummer MAB4234.

Tabelle 7: Für die Immunhistochemie verwendete primäre und sekundäre Antikörper.

Spezies	Spezifität	Klonalität	Konjugation	Verdünnung	Hersteller/ Bestellnummer
Ziege	h/m/rAdamts16	PAK	-	1:50	Santa Cruz Biotechnology; sc-67440
Kaninchen	h/m/rAdamts16	PAK	-	1:15	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg); sc-50490
Kaninchen	h/mAdamts16	PAK	-	1:500	Abcam, Cambridge (UK); ab45048
Maus	hWt1	MAK	-	1:300	Millipore (Darmstadt); MAB4234
Kaninchen	h/mWt1	MAK	-	1:200	Abcam; ab140484
Maus	h/m/rPan-Zytokeratin	MAK	FITC	1:100	Sigma-Aldrich (München); F3418
Esel	Kaninchen-IgG	PAK	Cy3	1:200	Jackson ImmunoResearch (Hamburg); 711-165-152
Esel	Ziege-IgG	PAK	Cy3	1:200	Jackson ImmunoResearch; 705-166-147
Esel	Maus-IgG	PAK	Alexa Fluor 488	1:90	Jackson ImmunoResearch; 715-545-151
Esel	Kaninchen-IgG	PAK	Dy-Light 488	1:100	Jackson ImmunoResearch; 711-485-152

Für die immunhistochemischen Färbungen der Nierenkulturen wurden die Organe nach der Vivo-Morpholino-Behandlung zunächst mit 4 % Paraformaldehyd (in PBS) für 20 min bei 4 °C fixiert, dann für 30 min mit 50 mM Ammoniumchloridlösung und über Nacht in Blockierlösung inkubiert. Die Inkubation mit dem Primär- und Sekundär-Antikörper (in

antibody diluent) erfolgte jeweils über Nacht. Die Anzahl der Ureterverästelungen wurde mit Hilfe der ImageJ Software (National Institutes of Health, Bethesda (USA)) ausgewertet.

3.2.14 *in vitro* Transkription und *in situ* Hybridisierung

Für die *in vitro* Transkription (IVT) und die DIG-Markierung der *antisense* und *sense* RNA-Sonden wurde der DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. Die Klonierung der verwendeten Plasmide ist in Kap. 3.2.1 beschrieben, wobei die fertigen Plasmide vor der IVT linearisiert und anschließend mittels QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden) aufgereinigt wurden. Nach der IVT wurden eine Fällung der RNA mittels 0,1 M LiCl₂ und 70 % (v/v) Ethanol bei -80 °C mit anschließender Lösung des Pellets in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H₂O durchgeführt. Die Herstellung der Ratten-RNA-Sonden erfolgte mittels Sp6- und T7-Polymerase, wohingegen die Maus-RNA-Sonden mit zwei verschiedenen Plasmiden jeweils nur mit der T7-Polymerase transkribiert wurden (s. Kap. 3.2.1, Tab. 2). Die fertigen Sonden wurden in einem 1 % Agarosegel überprüft.

Für die *in situ* Hybridisierung wurden Embryonen terminiert verpaarter C57BL/6J-Mäuse bzw. die Gonaden von adulten C57BL/6J-Mäuse und die Nieren adulter Wistar-Ratten verwendet. Alle Gewebe wurden sofort nach der Entnahme kurz in PBS gewaschen, mit Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura Finetek, Zoeterwoude (Niederlande)) eingebettet und bei -80 °C gelagert. Die 7 µm dicken Kryoschnitte wurden auf Superfrost® Plus Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) aufgebracht und bei -80 °C gelagert.

Nach dem Trocknen der Schnitte bei RT erfolgte eine 10-minütige Fixierung in 4 % Paraformaldehyd (in PBS), eine 10-minütige Inkubation mit Acetylierungspuffer und eine mehrstündige Prähybridisierung in Hybridisierungspuffer (ohne Sonde) in einer feuchten Kammer (Puffer K). Die Hybridisierung mit 2 µl RNA-Sonde in Hybridisierungspuffer wurde über Nacht bei 68 °C in 4-Well-Schalen (Quadriperm, Greiner Labortechnik) in einer feuchten Kammer (Puffer K) durchgeführt. Nach mehreren Waschschritten (65 °C) mit 5 x SSC, Formamidpuffer und NTE-Puffer erfolgte ein halbstündiger RNase-Verdau (37 °C) in NTE-Puffer, gefolgt von erneuten Waschschritten mit NTE-Puffer (65 °C), 2 x SSC (65 °C), 0,2 x SSC (RT) und Maleinsäurepuffer (RT). Die Schnitte wurden daraufhin für 1,5 h mit 1 % Blockinglösung (Roche) in Maleinsäurepuffer blockiert und dann über Nacht mit Roche Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (1:1000 in 1 % Blockinglösung) bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit MABT-Puffer

wurde der gebundene Antikörper mit Hilfe des NBT/BCIP Reagenz (Roche) in NTMT-Puffer nach Herstellerangaben detektiert. Das Eindeckeln der Schnitte erfolgte mit Aquatex[®] (Merck, Darmstadt).

3.3 *in silico* Sequenzanalyse

Für die *in silico* Sequenzanalyse des *Adamts16*-Promotors (NCBI Gene ID: 271127) auf mögliche Wt1-Konsensussequenzen wurden die Computerprogramme MatInspector (©Genomatix Software GmbH) und Targetfinder (©2012, www.targetfinder.org) verwendet.

3.4 Statistik

Alle Werte wurden im Mittel \pm Standardabweichung (SD) bzw. im Mittel \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Zur Auswertung von quantitativen RT PCR-Daten wurden der ungepaarte bzw. gepaarte Student's *t*-Test (Sigma Plot 9.0, SYSTAT Data, Erkrath) verwendet. Bei Vergleichen von mehr als zwei Proben untereinander erfolgte eine Auswertung mittels ANOVA und dem Tukey-Test als Post-hoc-Test (SPSS Statistics 20, IBM, Berlin). Ein Unterschied von $P < 0,05$ wurden als signifikant erachtet.

3.5 Puffer und Lösungen

Die Chemikalien (Analysequalität) folgender Firmen wurden verwendet: Biomol (Hamburg), Boehringer Ingelheim (Ingelheim), Invitrogen (Darmstadt), Merck (Darmstadt), PAA Laboratories (Cölbe), Promega (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München). Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser (Millipore Qualität) bzw. DEPC-H₂O angesetzt.

Tabelle 8: Puffer und Lösungen in der Reihenfolge ihrer Nennung im Material und Methodenteil.

Verwendung/ Name	Zusammensetzung
<i>Kryokonservierung Zellen</i>	
Gefriermedium	70 % (v/v) Kulturmedium; 20 % (v/v) FKS; 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid
<i>Primäre Organkulturen</i>	
1 x PBS	0,2 g/l KCl; 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ ; 8 g/l NaCl; 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄

Verwendung/ Name	Zusammensetzung
<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	
5 x TBE-Puffer	54 g/l Tris-HCl; 27,5 g/l Borsäure; 10 mM Ethyldiamintetraacetat (EDTA)
5 x DNA-Ladepuffer	42,5 % (v/v) Glycerin; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
<i>Klonierung</i>	
LB-Medium	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 0,1 % (v/v) 1 M NaOH (pH 7) (± 100 µg/ml Ampicillin)
Ampicillin-Agarplatten	LB-Medium; 15 g/l Agarose; 100 µg/ml Ampicillin
Kanamycin-Agarplatten	LB-Medium, 15 g/l Agarose; 50 µg/ml Kanamycin
Gefriermedium Bakterien	65 % Glycerin (v/v); 0,1 M MgSO ₄ ; 0,025 M Tris-HCl (pH 8)
<i>DNA-Extraktion</i>	
PBND-Puffer	50 mM KCl; 10 mM Tris (pH 8,3); 2,5 mM MgCl ₂ ; 0,1 mg/ml Gelatine; 0,45 % Tween 20; 300 mg/ml Proteinase K; 0,45 % Nonidet-P40
<i>Proteinextraktion</i>	
Laemmli-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 6,8); 4 M Harnstoff; 1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS); 7,5 mM Dithiothreitol (DTT)
<i>SDS-PAGE, Western Blot</i>	
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl; 0,4 % (w/v) SDS (pH 8,8)
Sammelgelpuffer	1 M Tris-HCl; 0,8 % (w/v) SDS (pH 6,8)
Polyacrylamid-Trenngel	0,25 Vol Acrylamid-Bisacrylamid (AA/BA) (w/v: 30/0,8); 0,25 Vol Trenngelpuffer; 0,5 µl/ml Tetramethylethyldiamin (TEMED); 5 µl/ml Ammoniumperoxodisulfat (APS)
Polyacrylamid-Sammelgel	0,11 Vol AA/BA (w/v, 30/0,8); 0,125 Vol Sammelgelpuffer; 1 µl/ml TEMED; 10 µl/ml APS
10 x SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris-Base; 1,92 M Glycin; 1 % (w/v) SDS (pH 8,3)
1 x Blottingpuffer	10 mM 6-Aminohexansäure; 10 % (v/v) Methanol
TBST-Puffer	20 mM Tris-Base; 137 mM NaCl; 0,05 % Tween 20 (pH 7,6)
<i>EMSA</i>	
EMSA-Reaktionspuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 50 mM KCl; 50 mM NaCl; 1 mM MgCl ₂ ; 1 mM EDTA; 5 mM DTT; 5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
6 % Polyacrylamidgel	0,5 x TBE-Puffer; 6 % (w/v) AA/BA; 0,05 % (v/v) TEMED; 0,075 % (w/v) APS
5 x TBE-Puffer	s. Agarose-Gelelektrophorese
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl (pH 7,5)
MABT-Puffer	0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; 0,3 % (v/v) Tween 10 (pH 7,5)
EMSA-Entwicklungspuffer	0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl (pH 9,5)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA (pH 8,0)
<i>ChIP</i>	
Trypanblau (Zellzahlbest.)	0,4 % Trypanblau (w/v) in PBS
1 x PBS	s. Primäre Organkulturen
ChIP-Lysispuffer	1 % (w/v) SDS; 10 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl (pH 8,1)

Verwendung/ Name	Zusammensetzung
<i>ChIP</i>	
IP-Puffer	0,01 % (w/v) SDS; 1,1 (v/v) % Triton X-100; 1,2 mM EDTA; 16,7 mM Tris-HCl (pH 8,1)
5 x TBE-Puffer	s. Agarose-Gelelektrophorese
LS-Puffer	0,1 % (w/v) SDS; 1 % (v/v) Triton X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl (pH 8,1); 150 mM NaCl
HS-Puffer	0,1 % (w/v) SDS; 1 % (v/v) Triton X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl (pH 8,1); 500 mM NaCl
Lithium-Puffer	0,25 M LiCl; 1 % (v/v) Nonidet-P40; 1 % (w/v) Na-Desoxycholat; 1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl (pH 8,1)
TE-Puffer	s. EMSA
Elutionspuffer	1 % (w/v) SDS; 0,1 M NaHCO ₃
<i>Immunhistochemie</i>	
1 x PBS	s. Primäre Organkulturen
Ammoniumchloridlösung	1 x PBS; 50 mM Ammoniumchlorid
Blockierlösung	1 x PBS; 0,2 % (v/v) bovines Serum albumin; 0,05 % (v/v) Triton X-100
Nierenkulturen	
<i>IVT und ISH</i>	
1 x PBS	s. Primäre Organkulturen
Acetylierungspuffer	11,6 % (v/v) Triethanolamin; 2,5 µl/ml Acetanhydrid
Hybridisierungspuffer	50 % Formamid; 5 x SSC; 5 x Denhardts Lösung; 100 µg/ml Heringssperma DNA; 200 µg/ml Hefe-tRNA
20 x SSC	3 M NaCl; 0,3 M Na-Zitrat (pH 7,0)
Puffer K	50 % Formamid; 5 x SSC
Formamidpuffer	20 % Formamid; 0,5 x SSC
NTE-Puffer	0,5 M NaCl; 10 mM Tris (pH 7,0); 0,5 mM EDTA (pH 8,0)
Maleinsäurepuffer.	s. EMSA
MABT-Puffer	s. EMSA
NTMT-Puffer	0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl ₂ ; 0,1 % (v/v) Tween 20 (pH 9,5)

4 ERGEBNISSE

4.1 Identifikation des *Adamts16*-Gens als bisher unbekanntes Wt1-Zielgen

Für die Identifikation neuer Zielgene des Wilms-Tumor Transkriptionsfaktor, die Einblick in die Signalwege der Urogenitalentwicklung liefern können, wurde zunächst eine DNA-Microarray-Analyse durch die Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) durchgeführt. Zur Herstellung der eingeschickten RNA-Proben wurden M15-Zellen verwendet, die dem murinen Mesonephros entstammen und eine hohe, endogene Wt1-Expression aufweisen (20). Um festzustellen, welche Gene auf einen *Wt1*-Knockdown mit einem veränderten Expressionsniveau reagieren, wurde die *Wt1*-Expression in einer Probe durch eine Transfektion mit *Wt1* siRNA gehemmt, während in der zweiten mit *non-targeting* siRNA transfiziert wurde. Der erfolgreiche *Wt1*-Knockdown wurde mittels Western Blot bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die Microarray-Analyse zeigte eine deutliche Reduktion der *Adamts16* mRNA in den Proben, die mit *Wt1* siRNA behandelt worden waren, im Vergleich zu solchen mit einer *non-targeting* siRNA-Behandlung (Daten nicht gezeigt).

Aufbauend auf diesem Ergebnis kann erstmalig ein regulatorischer Zusammenhang zwischen der *Adamts16*-Expression und Wt1 festgestellt werden.

4.2 Wt1-abhängige Transkription des *Adamts16*-Gens in verschiedenen Zelllinien

Anhand einer Wt1-Überexpression bzw. eines -Knockdowns in verschiedenen Zelllinien und einer anschließenden *Adamts16* mRNA-Quantifizierung sollten die Daten der DNA-Microarray-Analyse verifiziert werden. Hierfür wurden sowohl die murinen M15-Zellen als auch die humanen 293-, UB27- und UD28-Zellen verwendet.

4.2.1 Murine M15-Zellen

Zunächst wurde die *Adamts16*-Expression in den M15-Zellen verglichen, die mit der *Wt1 antisense* oder *non-targeting* siRNA behandelt worden waren (Abb. 4). In Folge des siRNA-Knockdowns von *Wt1* konnte ein signifikanter Rückgang der *Adamts16* mRNA

verzeichnet werden. Lediglich etwa 10 % der Ausgangsmenge konnten noch gemessen werden. Die sichtlich abgeschwächte Bande für das Wt1-Protein im Western Blot nach der *Wt1* siRNA-Behandlung belegte die Effizienz des Knockdowns (Abb. 4; unten).

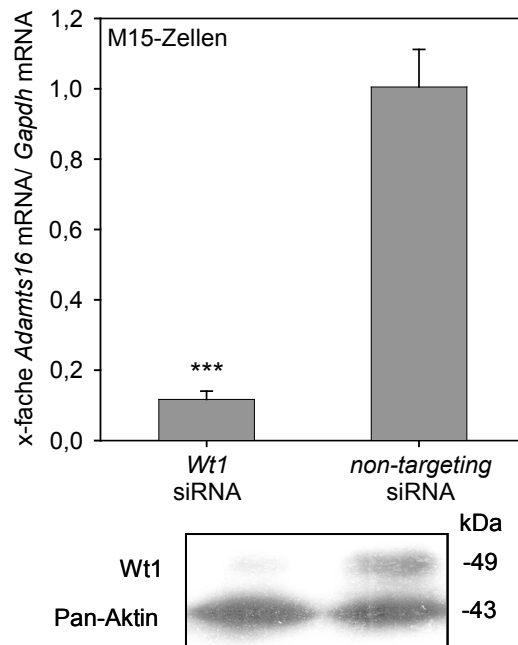


Abbildung 4: Die Hemmung der *Wt1*-Expression mittels siRNA in M15-Zellen resultierte in einer deutlich verringerten *Adamts16*-Expression im Vergleich zur Transfektion mit *non-targeting* siRNA. Dargestellt sind die *Adamts16* mRNA-Mengen in murinen Mesonephroszellen, welche zuvor entweder mit *Wt1* siRNA oder *non-targeting* siRNA inkubiert wurden. Die mRNA-Messung wurde mittels quantitativer RT-PCR durchgeführt, mit *Gapdh* als Kontrolle. Die Messwerte sind Mittelwerte \pm SEM von $n=4$ (***) $P < 0,001$; Student's *t*-Test). Der Western Blot zeigt Wt1 und Pan-Aktin (Ladekontrolle) nach der jeweiligen siRNA-Behandlung.

4.2.2 Humane 293-Zellen

Die 293-Nierenzellen wurden wahlweise mit einem Wt1(-KTS)- oder einem Wt1(+KTS)-Expressionsplasmid transfiziert, um die *ADAMTS16* mRNA-Mengen nach einer Überexpression der als Transkriptionsfaktor bekannten Wt1(-KTS)-Isoform im Verhältnis zur Wt1(+KTS)-Isoform darzustellen. Zusätzlich wurde zum Vergleich eine Transfektion nur mit dem Leervektor vorgenommen. Die Abbildung 5 zeigt einen signifikanten, mehr als 4-fachen Anstieg des *ADAMTS16* mRNA-Niveaus nach der Transfektion mit dem Wt1(-KTS)-Expressionsplasmid verglichen zur Transfektion mit dem Leervektor. Die Überexpression der Spleißisoform Wt1(+KTS), die zwischen dem dritten und vierten Zinkfingermotiv zusätzlich die Aminosäuren Lysin, Threonin und Serin besitzt und

demzufolge eine verringerte DNA-Bindungsfähigkeit aufweist (21), hatte hingegen keinen Einfluss auf das *ADAMTS16* mRNA-Niveau. Der Western Blot (Abb. 5; unten) belegt für beide Wt1-Isoformen eine gelungene Proteinüberexpression, wohingegen nach der Leervektor-Transfektion kein Wt1-Protein nachgewiesen werden konnte.

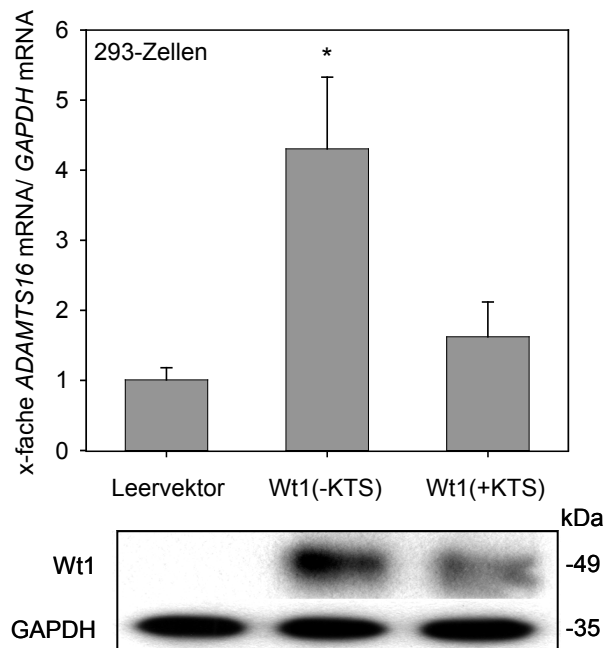


Abbildung 5: Die Transfektion eines Wt1(-KTS)-Expressionsplasmids, nicht jedoch eines Wt1(+KTS)-Expressionsplasmids, führte in humanen embryonalen Nierenzellen zu einem Anstieg der Menge der *ADAMTS16*-Transkripte. Dargestellt sind die *Adamts16* mRNA-Mengen von 293-Zellen, die entweder mit einem der Expressionsplasmide für Wt1(-KTS) bzw. Wt1(+KTS) oder dem Leervektor transfiziert wurden. Die mRNA-Messungen erfolgten mittels quantitativer RT-PCR, wobei *GAPDH* als Kontrolle diente. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils $n=3$ (* $P<0,05$; Student's *t*-Test). Der Western Blot zeigt die Wt1- und GAPDH-Proteinmengen (Ladekontrolle) für jede Bedingung.

4.2.3 Humane Osteosarkomzellen

Die beiden humanen Osteosarkomzelllinien UB27 und UD28 wurden für die Expressionsanalysen ausgewählt, da sie eine induzierbare Wt1(-KTS)- (UB27) bzw. Wt1(+KTS)-Expression (UD28) besitzen (129). Das integrierte Tet-Off-System ermöglicht es, die Wt1-Produktion durch eine Tetrazyklinzugabe in das Kulturmedium zu reprimieren. Das Entfernen resultiert entsprechend in einer Transkriptionsaktivierung des *Wt1*-Gens. Durch den Einsatz von Tetrazyklin-freiem Zellkulturmedium konnte bei beiden Zelllinien ein schrittweiser Anstieg der Wt1-Proteinmenge verzeichnet werden (Abb. 6A+B; unten). Wie der Western Blot zeigt, benötigten beide Zelllinien etwa 48-72 h, um das maximale Wt1-Expressionsniveau zu erreichen.

Die stetige Zunahme an Wt1(-KTS)-Protein in den UB27-Zellen resultierte in einem zeitlich geringfügig verzögerten, signifikanten Anstieg der *ADAMTS16* mRNA (Abb. 6A).

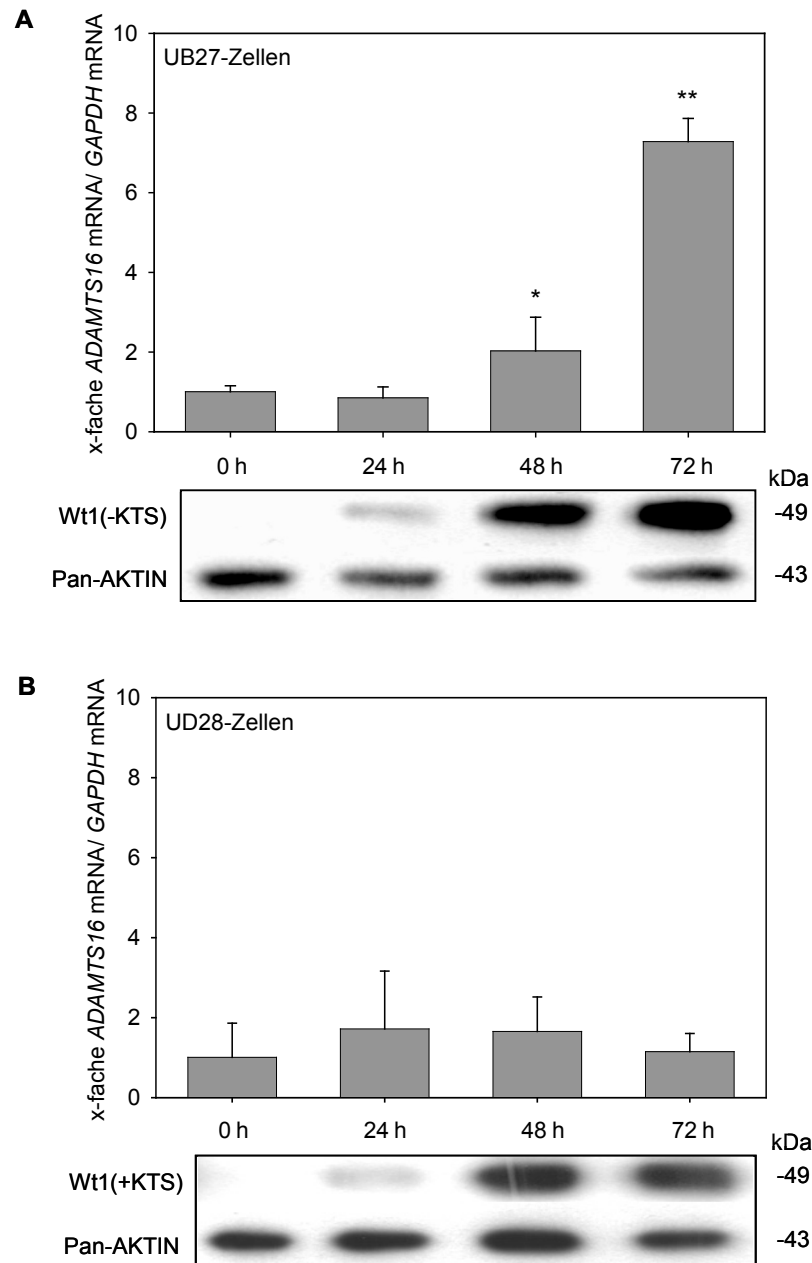


Abbildung 6: Die Überexpression von Wt1(-KTS) in UB27-Zellen führte, im Gegensatz zur Überexpression von Wt1(+KTS) in UD28-Zellen, zu einem Anstieg des *ADAMTS16* mRNA-Niveaus. A und B: Die Diagramme stellen die Mengen an *ADAMTS16* mRNA mit der Veränderung der Wt1(-KTS)-Proteinmenge in UB27-Zellen (A) bzw. Wt1(+KTS)-Protein in UD28-Zellen (B) dar. Die mRNA-Mengen wurden, mit *Gapdh* als Kontrolle, mittels quantitativer RT-PCR gemessen. Die Messwerte sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils $n=3$ (** $P<0,01$; * $P<0,05$; Student's *t*-Test). Der Western Blot zeigt Wt1 und Pan-AKTIN (Ladekontrolle) jeweils vor und nach der Wt1-Überexpression.

Nach 72 h war in etwa die 8-fache mRNA-Menge im Vergleich zum Startzeitpunkt vorhanden. In den UD28-Zellen konnte hingegen auch nach einer deutlichen Wt1(+KTS)-Akkumulation keine Erhöhung der *ADAMTS16* mRNA-Menge verzeichnet werden (Abb. 6B).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *Adamts16*-Expression in allen untersuchten Zelllinien durch eine erhöhte Wt1(-KTS)-Proteinmenge stimuliert wird. Die Wt1(+KTS)-Isoform hat hingegen keinen Einfluss auf die Expression des *Adamts16*-Gens *in vitro*.

4.3 Renale Adamts16-Lokalisation und Nachweis einer Koexpression mit Wt1

Die *Adamts16*-Expression wurde bereits in der Niere beschrieben, bisher jedoch lediglich auf der Grundlage von PCR-Experimenten (58). Auf Grund des gezeigten regulatorischen Zusammenhangs zwischen *Adamts16* und Wt1 (Abb. 4-6) sollte das Vorliegen einer Koexpression beider Proteine untersucht werden. Da Wt1 essentiell für die Nierendifferenzierung ist und nachgewiesenermaßen u.a. in den Podozyten der Glomeruli exprimiert wird (44), wurde zunächst die Niere auf eine mögliche Koexpression untersucht.

4.3.1 Adulte Niere

Durch eine *in situ* Hybridisierung mit einer spezifischen *Adamts16 antisense* RNA-Sonde konnten erstmals die Podozyten als Expressionsort von *Adamts16* in der adulten Rattenniere identifiziert werden (Abb. 7A). Die Anwendung von immunhistologischen Färbetechniken auf Kryoschnitten bestätigte dies (Abb. 7B). Es konnte mit Hilfe von Antikörpern gegen Adamts16 und Wt1 in einer Immundoppelfärbung die Koexpression beider Proteine in den glomerulären Podozyten visualisiert werden. Wt1 war erwartungsgemäß im Kern lokalisiert, wohingegen Adamts16 extranukleär nachweisbar war. Die Verwendung von Normalseren anstelle von Primärantikörpern erbrachte keine Färbung. Da es sich bei den Immunfärbungen im Fall von Adamts16 um eine Erstbeschreibung handelte, wurde neben dem Adamts16-Antikörper sc-67440 (AKI) ein weiterer Adamts16-Antikörper (sc-50490) (AKII) eingesetzt, dessen Adamts16-Bindungsfähigkeit zudem durch einen Western Blot überprüft wurde (Daten nicht gezeigt).

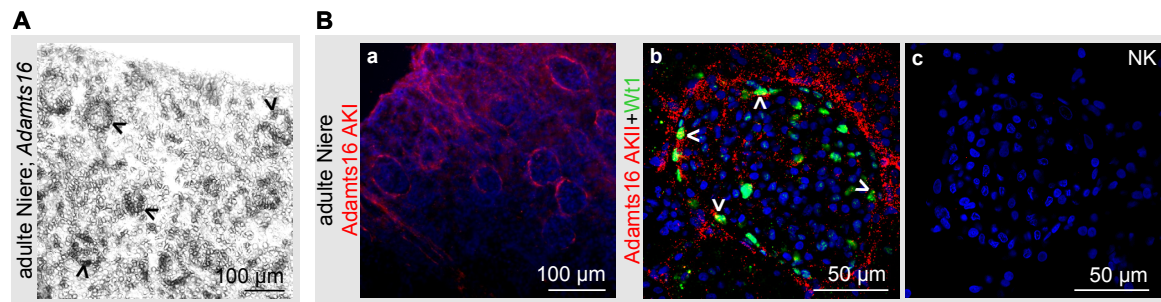


Abbildung 7: Die adulten glomerulären Podozyten wiesen eine Koexpression von Adamts16 und Wt1 auf. A: *In situ* Hybridisierung mit einer *Adamts16* antisense Sonde auf dem Gewebe einer adulten Rattenniere (Nierenrinde mit Glomeruli). Beispiele der Adamts16-Färbung (>) B: Gezeigt sind eine Einzelfärbung von Adamts16 (●) mit AKI in einem Ausschnitt einer adulten Rattennierenrinde (a) und eine Doppelfärbung von Adamts16 mit AKI und Wt1 (●) (b; NK in c) im Querschnitt eines adulten Rattenglomerulus. Zellkerne (●); Beispiele für Einzel- bzw. Doppelfärbung (>)

4.3.2 Embryonale Niere

Mit Hilfe einer *in situ* Hybridisierung konnte die Lokalisation der *Adamts16* mRNA in der murinen embryonalen Niere (14,5 d.p.c.) in den sich entwickelnden Glomeruli bestätigt werden. Die Verwendung einer *Adamts16* sense Negativkontrollsonde erbrachte keine Färbung (Abb. 8A). Entsprechend der mRNA-Lokalisation verhielt es sich mit dem Adamts16-Proteinnachweis mittels Immunfärbung (Abb. 8B). Die Metalloproteinase konnte in der embryonalen Mausniere, gleichermaßen wie das bereits beschriebene Wt1 (44), in den differenzierenden Glomeruli lokalisiert werden. Neben den Einzelfärbungsnachweisen wurden Doppelimmunfärbungen von Adamts16 und Wt1 auf Schnittpräparaten einer embryonalen Rattenniere mit zwei verschiedenen Adamts16-Antikörpern angefertigt. Beide zeigten abermals eine Koexpression von Adamts16 und Wt1 in den Podozyten. Die jeweils mit den Doppelfärbungen korrespondierenden Einzelfärbungen veranschaulichen die extranukleäre Lokalisation von Adamts16 bzw. das nukleäre Vorkommen von Wt1. Die Negativkontrollen mit einem Normalserum anstelle eines Primärantikörpers führten zu keinen Färbungen.

Auf Grund dieser Ergebnisse lässt sich feststellen, dass Adamts16 in der murinen embryonalen und adulten Niere in den glomerulären Podozyten exprimiert wird und dort eine Koexpression mit Wt1 aufweist.

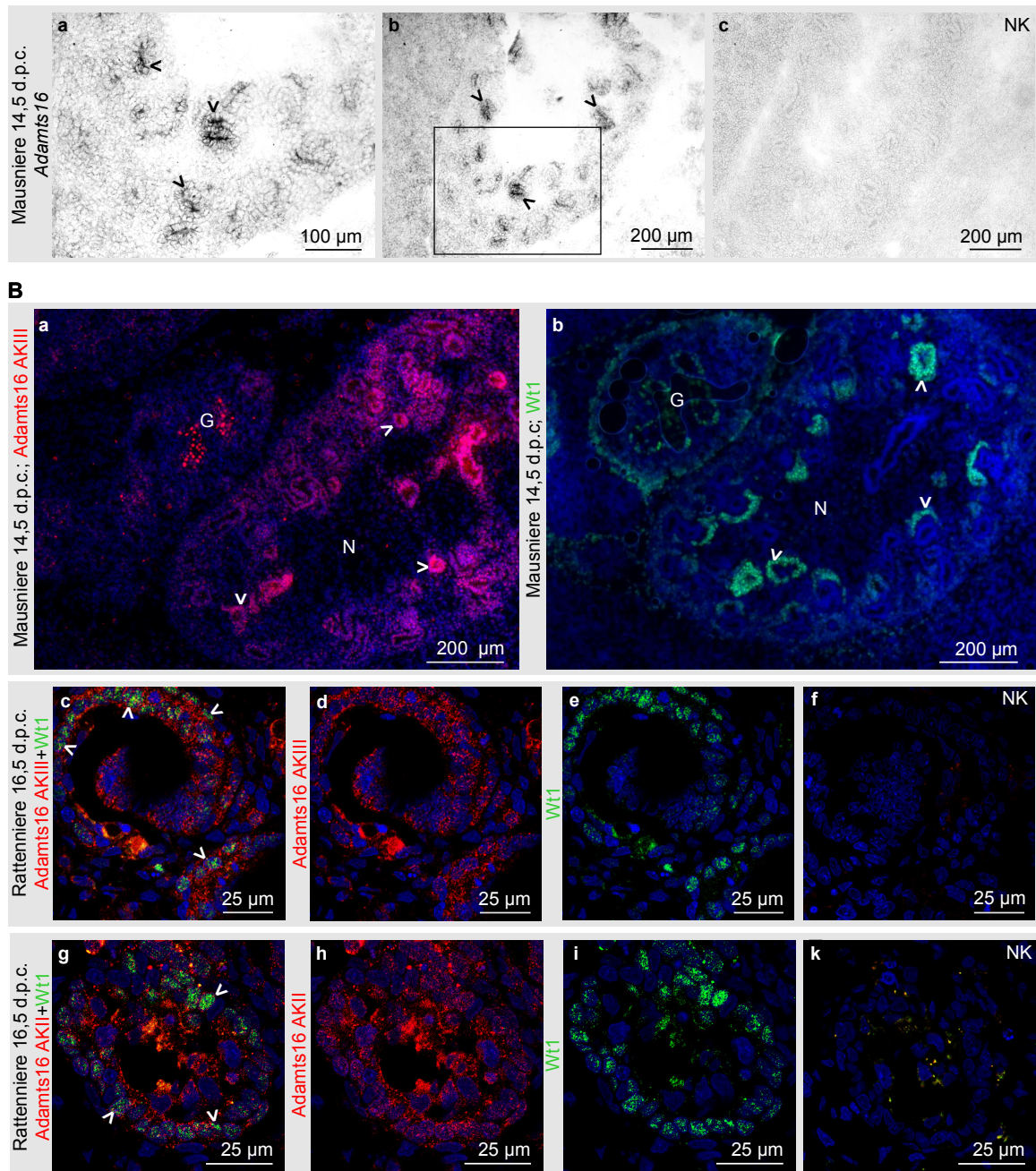


Abbildung 8: Die differenzierenden Glomeruli der murinen embryonalen Niere wiesen eine Koexpression von Adamts16 und Wt1 auf. A: *In situ* Hybridisierung mit einer Adamts16 antisense Sonde (a+b) auf Kryoschnitten einer Mausnieren (14,5 d.p.c.) mit a als vergrößertem Ausschnitt aus b (NK in c). Beispiele der Adamts16-Färbung (>) B: Gezeigt sind Einzelfärbungen (a+b) von Adamts16 (●) mit AKIII und Wt1 (●) auf Serienschnitten einer Mausnieren (14,5 d.p.c.) und Doppelfärbungen von Adamts16 mit AKIII (c) bzw. AKII (g) und Wt1 (c+g) auf Schnitten eines unreifen Glomerulus einer embryonalen Rattenniere (16,5 d.p.c.). Die jeweiligen Einzelfärbungen zu c und g sind in d+e bzw. h+i abgebildet (NK in f+k). Zellkerne (●); Beispiele für Einzel- bzw. Doppelfärbung (>); Gonade (G); Niere (N)

4.4 Regulatorischer Einfluss eines Wt1-Knockdowns auf die *Adamts16*-Expression in embryonalen Nierenkulturen

Durch die histologisch nachgewiesene Koexpression von *Adamts16* und *Wt1* in der Niere stellte sich die Frage, ob *Wt1* dort tatsächlich für eine normale Transkription von *Adamts16* erforderlich ist.

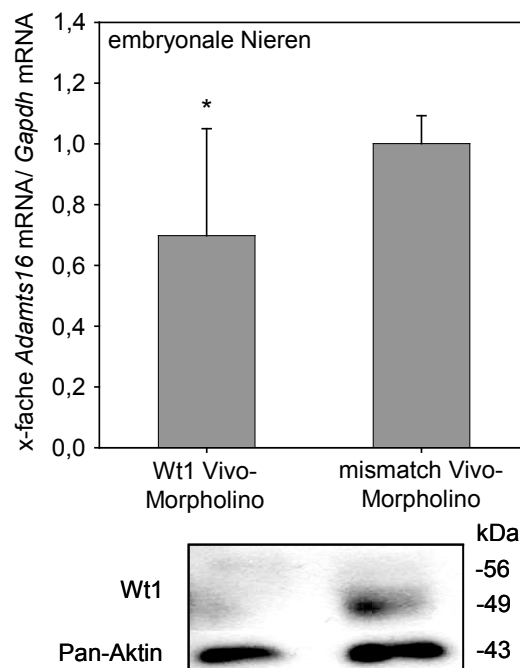


Abbildung 9: Der Vivo-Morpholino-Knockdown von Wt1 in embryonalen Nierenkulturen führte zu einer verminderten *Adamts16*-Expression. Dargestellt ist die *Adamts16* mRNA-Menge der murinen embryonalen Nieren, die zuvor jeweils mit Wt1 Vivo-Morpholinos oder mismatch Vivo-Morpholinos behandelt wurden. Die Quantifizierung der mRNA wurde mittels quantitativer RT-PCR durchgeführt, mit *Gapdh* als Kontrolle. Die Messwerte sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils $n=7$ (* $P<0,05$; Student's gepaarter t -Test). Der Western Blot zeigt Wt1 und Pan-Aktin (Ladekontrolle) nach der jeweiligen Vivo-Morpholino-Behandlung.

Die Verwendung von heterozygot *Wt1*-defizienten Mäusen war für diese Experimente nicht möglich, da in diesen Tieren bereits die Nierenanlagen apoptotisch sind. Deshalb wurden paarige embryonale Nierenexplantate aus Wildtyp-Mäusen zum Entwicklungszeitpunkt 13,5 d.p.c. kultiviert und jeweils entweder mit Wt1 Vivo-Morpholinos oder mismatch Vivo-Morpholinos inkubiert (Abb. 9). Die Effizienz der Wt1 Vivo-Morpholino-Behandlung, die eine Hemmung der *Wt1*-Translation induziert, konnte durch einen Western Blot belegt werden (Abb. 9; unten). Die beiden Banden bei 49 kDa und 56 kDa

zeigen unterschiedlich lange Spleißisoformen des Wt1-Proteins, wobei die Wt1 Vivo-Morpholinos die Translation der regulatorisch aktiven, kürzeren Isoform (49 kDa) hemmen. Der Western Blot zeigt, dass der Wt1-Knockdown in einer Reduktion des Wt1-Proteins um knapp 60 % resultierte. Die Explantate mit einer gehemmten Wt1-Translation wiesen, verglichen mit den korrespondierenden mismatch Vivo-Morpholino-Negativkontrollen, eine signifikant verringerte Menge an *Adamts16*-Transkripten auf.

Das Ergebnis deutet darauf hin, dass Wt1 für eine normale mRNA-Expression von *Adamts16* in murinen embryonalen Nieren benötigt wird.

4.5 Funktionelle Rolle von *Adamts16* in der murinen embryonalen Niere

Um Hinweise auf die möglichen Funktionen von *Adamts16* in der Niere zu erhalten, wurden murine embryonale Nieren zum Zeitpunkt 11,5 d.p.c. explantiert, und entweder mit *Adamts16* oder mismatch Vivo-Morpholinos behandelt (Abb. 10A). Die Phasenkontrastaufnahmen zeigen, dass nach einer Hemmung der Translation von *Adamts16* im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit mismatch Vivo-Morpholinos deutliche Unterschiede in der Größe und dem Differenzierungszustand der kultivierten Organe auftraten. Zur besseren Veranschaulichung wurden Immundoppelfärbungen mit Pan-Zytokeratin und Wt1 durchgeführt. Pan-Zytokeratin wird in dem aussprossenden Ureter exprimiert, wohingegen Wt1 im metanephrogenen Blastem vorkommt (26, 132). Die Immundoppelfärbungen und die Analyse der Anzahl der Ureterverästelungen verdeutlichen zum einen, dass die Explantate nach der *Adamts16* Vivo-Morpholino-Behandlung insgesamt kleiner waren und zum anderen, dass die Verästelung des Ureters geringer ausgeprägt war. Die statistische Auswertung der Zahl der Ureterverästelungen aller Experimente ergab nach der *Adamts16*-Translationsinhibition eine durchschnittliche Halbierung der Verästelungen (Abb. 10B). Der repräsentative Western Blot im unteren Teil der Abbildung 10B bestätigte den *Adamts16*-Knockdown. Bei etwa 136 kDa, der vorhergesagten Größe des Proteins (124), war nach der Kontrollbehandlung mit mismatch Vivo-Morpholinos eine deutliche Bande für *Adamts16* sichtbar, die bei der mit *Adamts16* Vivo-Morpholinos transfizierten Kultur bedeutend schwächer war.

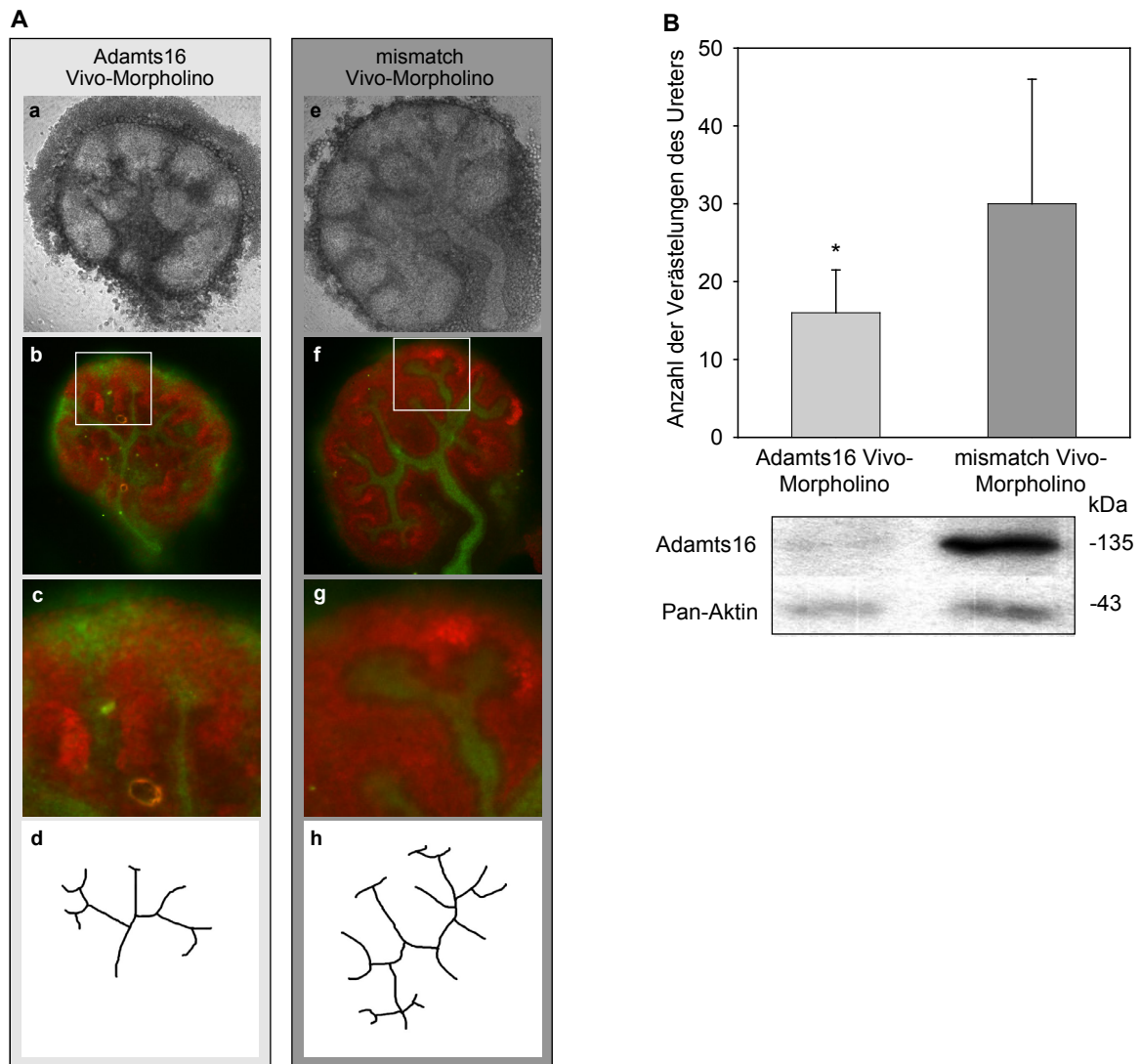


Abbildung 10: Die *ex vivo* Differenzierung von murinen embryonalen Nieren war nach einer Adamts16 Translationsinhibition signifikant beeinträchtigt. *A:* Die Bilder zeigen jeweils exemplarisch eine mit Adamts16 Vivo-Morpholinos (a-d) oder mismatch Vivo-Morpholinos (e-h) behandelte murine Niere (11,5 d.p.c). Die Differenzierungszustände der Explantate wurden mittels Phasenkontrastmikroskopie (a+e) und Immundoppelfärbung mit Pan-Zytokeratin (●) und Wt1 (●) (b+c, f+g) dokumentiert, wobei c und g vergrößerte Ausschnitte aus b und f darstellen. In d und h sind Rekonstruktionen der Verzweigungsmuster der Ureter gezeigt. *B:* Das Diagramm gibt die Anzahl der Verästelungen des Ureters nach der Behandlung mit Adamts16 oder mismatch Vivo-Morpholinos an. Die Messwerte sind Mittelwerte ± SEM von n=7 (* $P < 0,02$; Student's gepaarter *t*-Test). Der Western Blot zeigt Adamts16 und Pan-Aktin (Ladekontrolle) nach der jeweiligen Vivo-Morpholino-Behandlung.

Zusammengefasst verdeutlichen die Ergebnisse, dass Adamts16 eine funktionelle Rolle in der Ausdifferenzierung des Ureters und damit in der murinen Nierenentwicklung *ex vivo* besitzt.

4.6 Adamts16-Lokalisation und Nachweis einer Koexpression mit Wt1 in murinen Gonaden

Die Abhängigkeit der *Adamts16*-Expression von Wt1 in den M15-Zellen (Abb. 4) und die bereits von Cal, *et al.* (58) beschriebene *Adamts16* mRNA-Expression im adulten Ovar ließen vermuten, dass Adamts16 in den murinen Gonaden lokalisiert sein könnte und eine Koexpression mit Wt1 vorliegen könnte. Dies wurde in murinen Gonaden entwicklungs- und geschlechtsabhängig untersucht.

4.6.1 Adulter Testis

Mit Hilfe einer *in situ* Hybridisierung mit einer spezifischen *Adamts16 antisense* Sonde konnte zunächst gezeigt werden, dass im adulten Testis der Maus, besonders in den elongierten Spermatiden, eine starke *Adamts16*-Expression vorhanden war. Eine Inkubation mit der entsprechenden *sense* Negativkontrollsonde zeigte keine spezifische Färbung (Abb. 11A). Die *Adamts16* mRNA ist nicht in allen angeschnittenen Hodenkanälchen sichtbar, da elongierte Spermatiden, bedingt durch die verschiedenen Stadien der Spermatogenese, nicht überall zeitgleich vorhanden sind.

Für den Proteinnachweis wurden auf Kryoschnitten eines Rattentestis Doppelfärbungen von Adamts16 und Wt1 durchgeführt (Abb. 11B). Wt1 konnte zunächst neben den Sertoli-Zellen auch in den Spermatozyten des angeschnittenen Hodenkanälchens nachgewiesen werden. Adamts16 war mit dem Adamts16-AKII sowohl dort als auch in unmittelbarer Umgebung der späten Spermatiden präsent. Die Negativkontrolle zeigte keine Färbung.

In den Abbildungen 11Bc und 11Bd wurde der Adamts16-Antikörper ab45048 (AKIII) verwendet, der eine besonders deutliche Immunfärbung in unmittelbarer Umgebung der Köpfe der späten Spermatiden zeigte. Zusätzlich war eine schwache Färbung der Spermatozyten erkennbar. Eine Wt1-Färbung trat auf diesen Schnittpräparaten nur in den Zellkernen der Sertoli-Zellen auf, jedoch nicht in den Spermatozyten.

Die Immunfärbungen mit den Adamts16-Antikörpern II und III identifizierten dieselben Zellpopulationen als Adamts16-positiv, der Schwerpunkt der Färbung lag jedoch bei dem AKII auf den Spermatozyten und Spermatiden, bei dem AKIII hingegen nur auf den Spermatiden. Zur Verifizierung des Ergebnisses wurde daher zusätzlich der Adamts16-AKI hinzugezogen. Dieser zeigte ein deutliches Vorkommen von Adamts16 in den sich ablösenden elongierten Spermatiden und zusätzlich eine zwar geringere, aber spezifische

Expression in den reifenden Spermatozyten. Die am äußeren Rand der Hodenkanälchen befindlichen Spermatogonien waren mit keinem der drei Antikörper Adamts16-positiv.

Die Bestimmung der einzelnen Zellarten des Hodenkanälchens erfolgte mikroskopisch anhand der charakteristischen Beschaffenheit der Zellkerne und der verhältnismäßigen Lage der Zellen innerhalb der Hodenkanälchen (vgl. auch Abb. 2). Eine Negativkontrolle mit Normalserum anstelle des Primärantikörpers führte zu keiner Färbung.

Adamts16 konnten im adulten Testis nur extranukleär lokalisiert werden, wohingegen Wt1 ausschließlich im Kern vorkam.

Diese Resultate zeigen, dass Adamts16 im adulten Testis primär von den späten Spermatisden exprimiert wird und keine signifikante Koexpression mit Wt1 vorliegt.

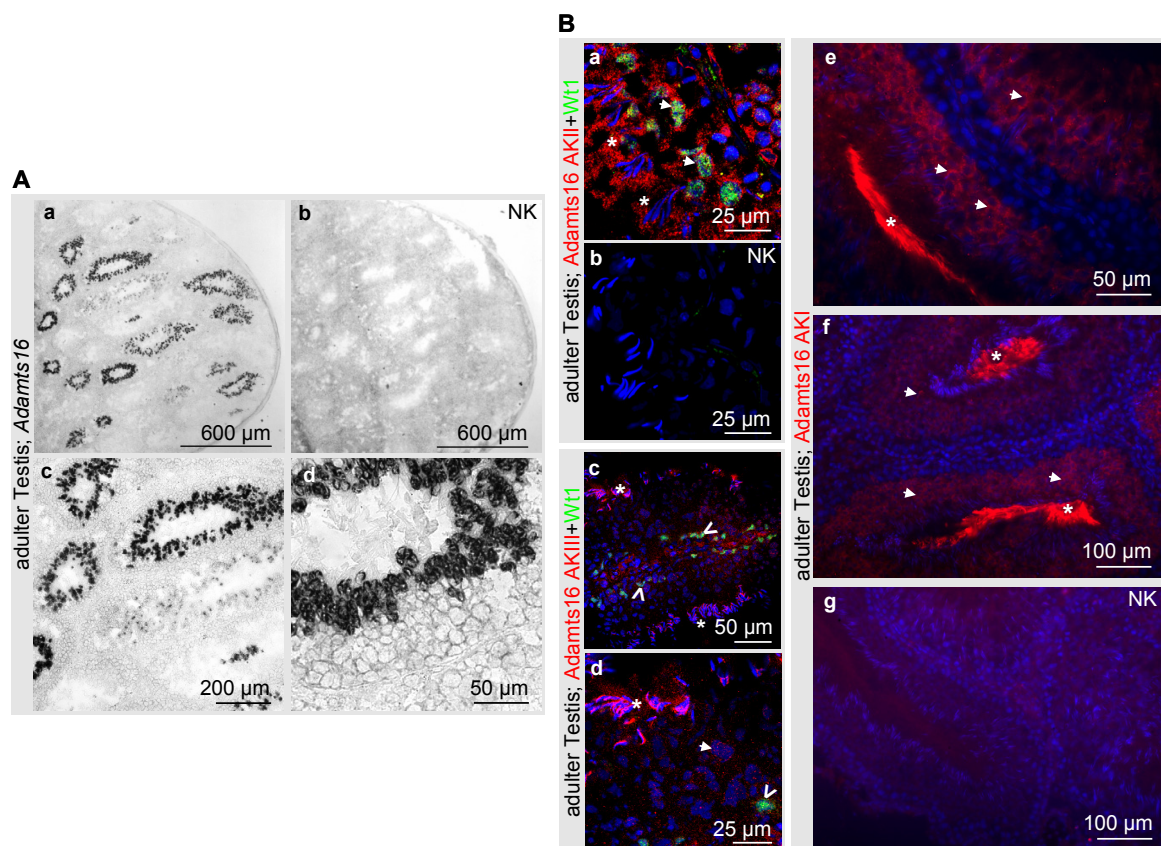


Abbildung 11: Adamts16 konnte auf mRNA- und Proteinebene vor allem in elongierten Spermatisden des adulten, murinen Testis nachgewiesen werden, wo es jedoch zu keiner Kolokalisation mit Wt1 kam. A: *In situ* Hybridisierung auf einem adulten Maustestis mit einer *Adamts16* antisense Sonde, wobei c und d jeweils vergrößerte Ausschnitte aus a zeigen (NK in b). B: Gezeigt sind Doppelfärbungen von Adamts16 (●) mit AKII (a; NK in b) bzw. AKIII (c+d) und Wt1 (●) und Einzelfärbungen von Adamts16 mit AKI (e+f; NK in g) auf Schnitten adulter Rattenhoden. Zellkerne (●); elongierte/späte Spermatisden (*); Sertoli-Zellen (>); Spermatozyten (▶)

4.6.2 Adultes Ovar

Da Wt1 in der Vergangenheit bereits in den follikulären Granulosazellen und dem Oberflächenepithel des Ovars beschrieben worden ist (52), wurde auch das murine Ovar mit Hilfe von Immundoppelfärbungen auf das Vorkommen von Adamts16 und eine mögliche Koexpression von Adamts16 und Wt1 untersucht.

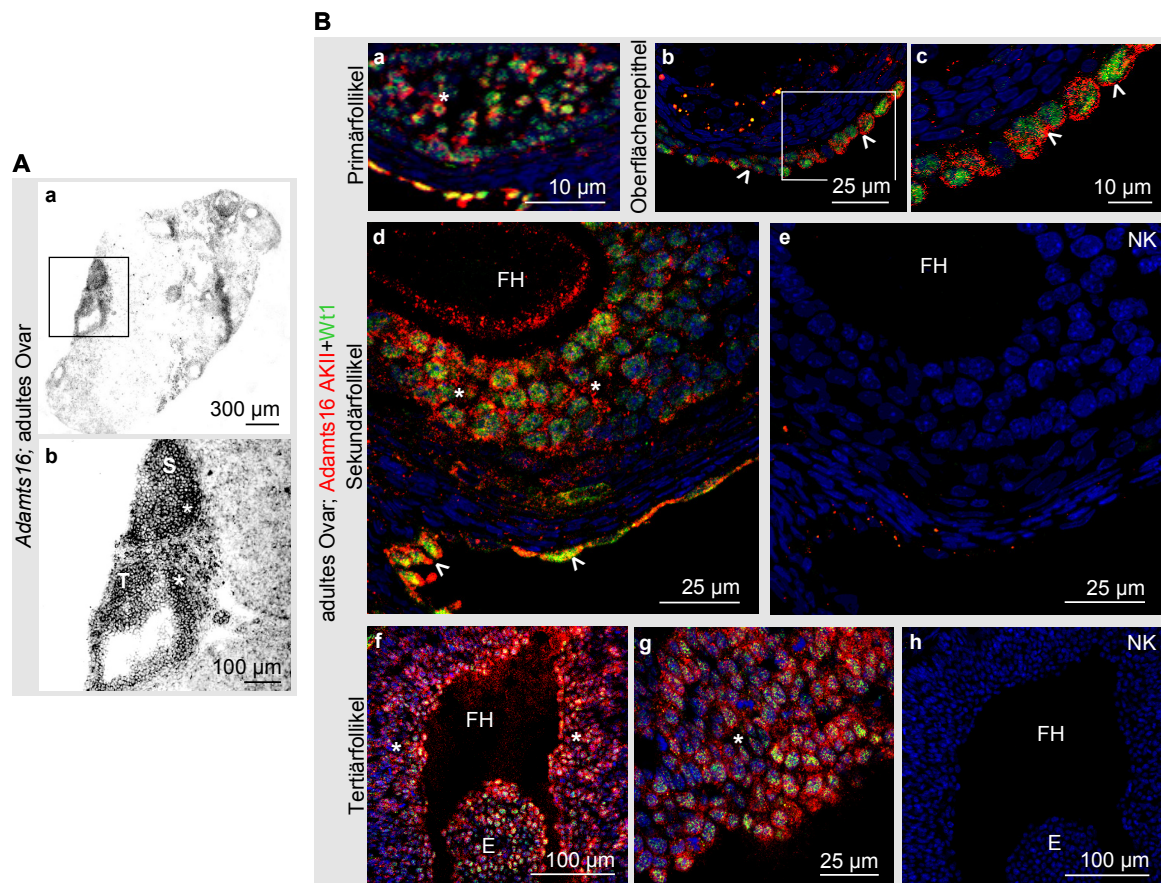


Abbildung 12: Adamts16 und Wt1 wurden im adulten Ovar sowohl in den Granulosazellen der verschiedenen Follikelstadien als auch im Oberflächenepithel koexprimiert. A: *In situ* mRNA-Hybridisierung auf Schnitten eines adulten Mausovars mit einer *Adamts16 antisense* Sonde (a+b), wobei b einen vergrößerten Ausschnitt aus a zeigt. Sekundärfollikel (S); Tertiärfollikel (T); Granulosazellen (*). B: Gezeigt sind Doppelfärbungen von Adamts16 (●) mit AKII und Wt1 (●) in einem Primärfollikel (a), dem periovarialen Epithel (b+c), einem Sekundärfollikel (d; NK in e) und einem Tertiärfollikel (f+g; NK in h) eines adulten Rattenovars. Zellkerne (●); Granulosazellen (*); Oberflächenepithel (>); Eihügel (E); Follikelhöhle (FH)

Durch eine *in situ* Hybridisierung mit einer spezifischen *Adamts16 antisense* Sonde konnte zunächst die bereits von Cal, *et al.* (58) beschriebene, ovariale mRNA-Expression von *Adamts16* nachgewiesen werden. Die Abbildung 12A zeigt ein adultes Mausovar, in dem die *Adamts16* mRNA u.a. in den Granulosazellen eines Sekundär- und eines

Tertiärfollikels angefärbt werden konnte. Die immunhistologischen Befunde in Abbildung 12B bestätigten dies. Bereits der murinen Primärfollikel wies eine deutliche Koexpression von Adamts16 und Wt1 in den Granulosazellen auf. Zudem ist erkennbar, dass beide Proteine im Oberflächenepithel des Ovars koexprimiert wurden. Die Abbildung 12Bd zeigt einen Sekundärfollikel in dem Adamts16 in den Granulosazellen lokalisiert war. Zusätzlich sieht man, dass die Follikelhöhle extrazelluläres Adamts16 aufwies. Die Immunfärbung des deutlich weiterentwickelten Tertiärfollikels deutet an, dass die Adamts16-Expression in den zur Follikelhöhle gelegenen Granulosazellen stärker ausgeprägt war als in den parietalen Granulosazellschichten. Auch die Granulosazellen des im unteren Bildabschnitt gezeigten Eihügels und die Follikelhöhle wiesen Adamts16 auf. Die Negativkontrollen zeigten keine Immunfärbungen. In allen Stadien der Follikelreifung und auch im Oberflächenepithel des Ovars war Wt1 kernständig, Adamts16 hingegen extranukleär bzw. extrazellulär lokalisiert.

Zusammengefasst wird anhand der Färbungen ersichtlich, dass Adamts16 in murinen Granulosazellen aller follikulären Reifungsstadien und im Oberflächenepithel des Ovars mit Wt1 koexprimiert wird.

4.6.3 Embryonaler Testis

Bisher konnten sowohl Adamts16 als auch Wt1 unabhängig voneinander im adulten Testis lokalisiert werden. Nachfolgend sollte geklärt werden, ob diese lokale Trennung bereits im embryonalen Organ vorliegt. Im Zuge dessen konnte zunächst das Vorkommen von *Adamts16* mRNA in den Keimsträngen der embryonalen männlichen Gonade (XY-Gonade) mit Hilfe einer *in situ* Hybridisierung dokumentiert werden. Der Einsatz einer *sense* Negativkontrollsonde anstelle der *Adamts16 antisense* Sonde zeigte keine spezifische Färbung (Abb. 13A).

Für den immunhistologischen Nachweis wurden die beiden bereits bei der embryonalen Niere verwendeten Adamts16-Antikörper II und III eingesetzt und ein Vergleich zwischen Ratten- und Mausgonade angestellt (Abb. 13B).

In der XY-Rattengonade (16,5 d.p.c.) lag, abgesehen von einer Koexpression beider Proteine in den die Gonade umgebenden Mesothelzellen, dem einzigen Expressionsort von Wt1, keine weitere Koexpression vor. Adamts16 war neben dem sehr schwachen mesothelialen Vorkommen markant in den Keimsträngen exprimiert, wobei zu beachten ist, dass Adamts16 dort auch nukleär lokalisiert war.

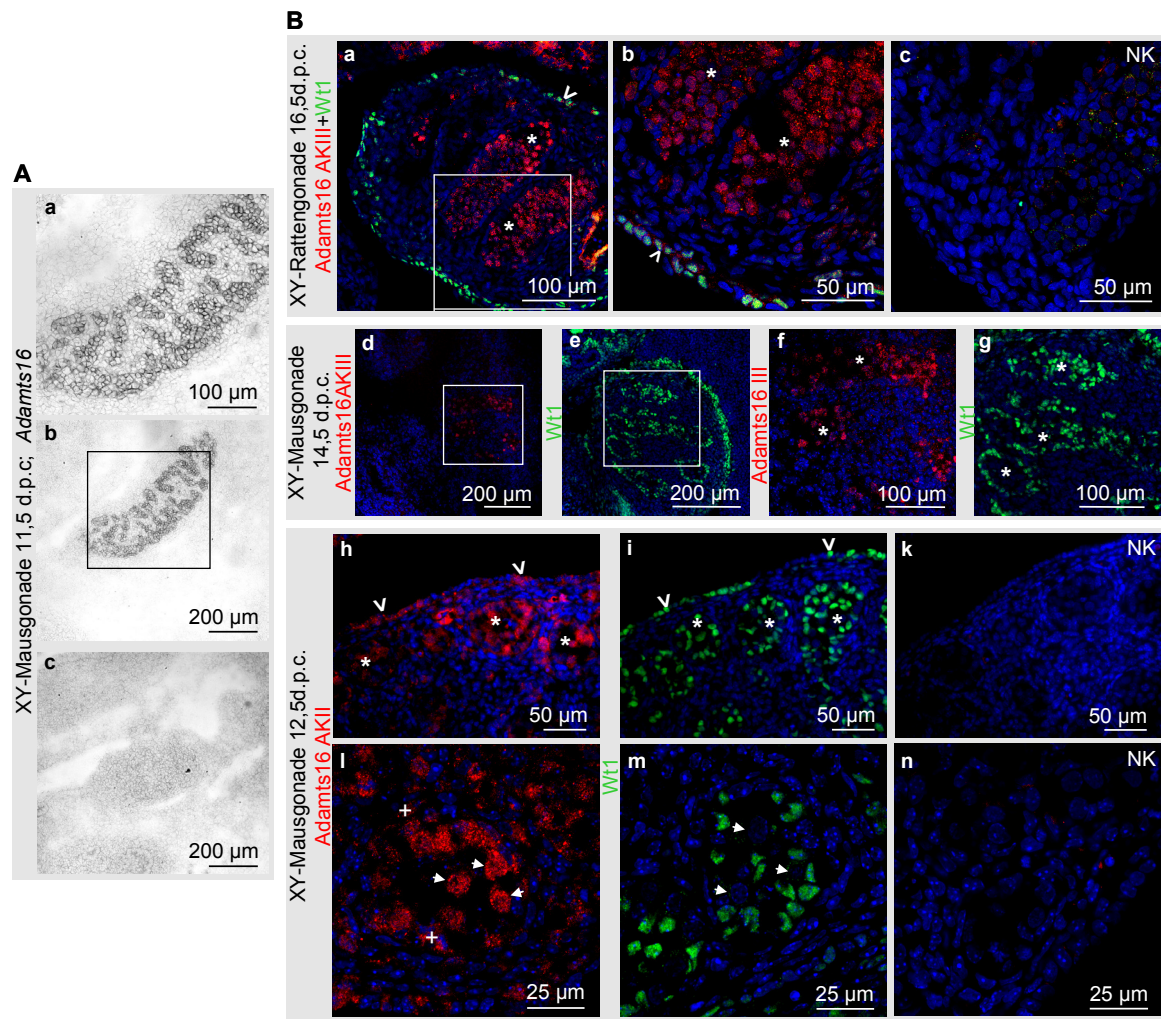


Abbildung 13: Adamts16 kam in den Keimsträngen der embryonalen XY-Gonade vor, war dort jedoch nicht mit Wt1 kolokalisiert. A: *In situ* Hybridisierung mit einer Adamts16 antisense Sonde auf Schnitten einer Mausgonade (11,5 d.p.c.) (a+b; NK in c), wobei a einen vergrößerten Ausschnitt aus b zeigt. B: Gezeigt sind Doppelfärbungen (a+b; NK in c) von Adamts16 (●) mit AKIII und Wt1 (●) auf Schnitten einer XY-Rattengonade (16,5 d.p.c.), Einzelfärbungen von Adamts16 mit AKIII (d; Vergrößerung in f) bzw. Wt1 (e; Vergrößerung in g) auf Schnitten einer XY-Mausgonade (14,5 d.p.c.) und Einzelfärbungen von Adamts16 mit AKII (h+i; NK in k+n) bzw. Wt1 (i+m; NK in k+n) auf Schnitten einer XY-Mausgonade (12,5 d.p.c.). Zellkerne (●); Keimstrang (*); Mesothel (>); extranukleäres Adamts16 (+); nukleäres Adamts16 (▶)

Auch die Einzelfärbungen der XY-Mausgonade (14,5 d.p.c.) zeigten keine eindeutige Kolokalisation beider Proteine. Auffällig ist, dass Wt1 nicht nur mesothelial, sondern auch in den randständigen Zellen der Keimstränge exprimiert war. Adamts16 konnte innerhalb der Keimstränge lokalisiert werden.

Obwohl die gemeinsame Lokalisation von Adamts16 und Wt1 in den männlichen Keimsträngen auf eine Koexpression hätte schließen lassen können, wurde bei genauer Betrachtung der Abbildungen 13Bl und 13Bm auffällig, dass die mit dem Adamts16-Antikörper gefärbten Zellkerne eher groß und rund waren, eben diese Kerne jedoch unter

Verwendung des Wt1-Antikörpers nicht angefärbt wurden. Es lag also keine nukleäre Koexpression beider Proteine vor. Sämtliche Negativkontrollen zeigten unter Verwendung von Normalseren anstelle der Antikörper keine Färbungen.

Insgesamt zeigen die Versuchsergebnisse, dass Adamts16 im murinen embryonalen Testis primär in den Keimsträngen exprimiert wird, wobei das nukleäre Adamts16 nicht mit Wt1 kolokalisiert ist. Eine Koexpression beider Proteine erfolgt in der äußeren, mesothelialen Zellschicht.

4.6.4 Embryonales Ovar

Für die Lokalisation von Adamts16 in der embryonalen weiblichen Gonade (XX-Gonade) wurden sowohl Maus- als auch Rattengewebeschnitte verwendet (Abb. 14).

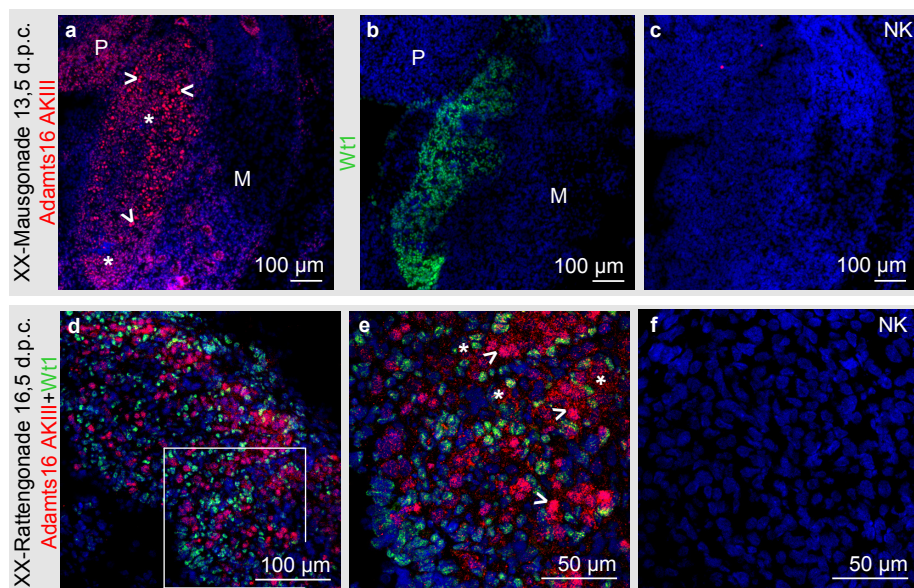


Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von Adamts16- und Wt1-Protein in der embryonalen weiblichen Gonade. Gezeigt sind Einzelstichaufnahmen von Adamts16 (●) mit AKIII (a, NK in c) und Wt1 (●) (b, NK in c) auf Serienschnitten einer XX-Mausgonade (13,5 d.p.c.) und Doppelstichaufnahmen (d+e; NK in f) von Adamts16 mit AKIII und Wt1 auf Schnitten einer XX-Rattengonade (16,5 d.p.c.). Zellkerne (●); nukleäres Adamts16 (>); extranukleäres Adamts16 (*)

Die Einzelstichaufnahmen der Mausgonade zeigten nicht nur eine nukleäre, sondern auch eine weitestgehend flächendeckende, extranukleäre Adamts16-Lokalisation. Das nukleäre Wt1-Vorkommen erstreckte sich ebenfalls über die gesamte Mausgonade, so dass teilweise eine Koexpression beider Proteine vorlag. Die Rattengonade zeigte eine ähnliche Proteinverteilung wie die Mausgonade, wobei erkennbar wurde, dass die Kernlokalisation

von *Adamts16* und *Wt1* stets in verschiedenen Zelltypen auftrat und keine nukleäre Kolokalisation stattfand. Negativkontrollfärbungen ergaben weder auf den Maus- noch auf den Rattenschnitten eine Färbung.

Grundsätzlich kann man für die embryonale XX-Gonade feststellen, dass eine Koexpression beider Proteine vorliegt, unabhängig davon jedoch zusätzlich eine kernständige *Adamts16*-Expression auftritt.

4.7 *Wt1*-abhängige *Adamts16*-Expression in embryonalen Gonaden

Wie bereits in der Niere sollte auch in den Gonadenanlagen überprüft werden, ob das Vorhandensein von *Wt1* einen wesentlichen regulatorischen Faktor in der Expression von *Adamts16* darstellt. Zu diesem Zweck wurden zunächst Gonadenanlagen von *Wt1*^{+/+}-, *Wt1*^{+/-}- und *Wt1*^{-/-}-Mausembryonen bezüglich ihrer *Adamts16*-Expression untersucht. Des Weiteren wurden XX- und XY-Gonadenkulturen mit und ohne *Wt1* Vivo-Morpholino-Behandlung im Hinblick auf ihre *Adamts16*-Expression analysiert.

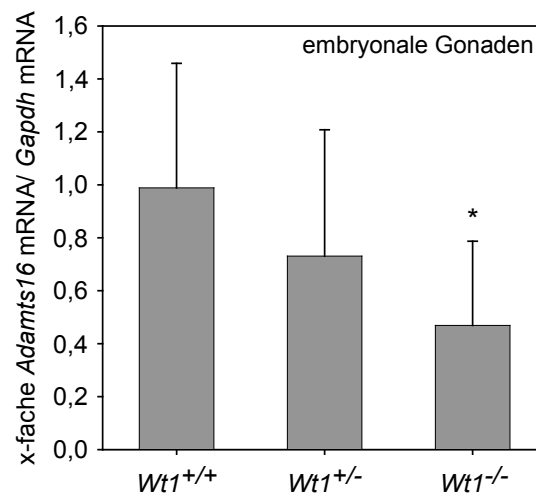


Abbildung 15: Die Menge an *Adamts16*-Transkripten war signifikant verringert in Gonaden embryonaler Knockoutmäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen. Dargestellt ist die *Adamts16* mRNA-Menge von Gonadenanlagen aus *Wt1*^{+/+}-, *Wt1*^{+/-}- und *Wt1*^{-/-}-Mäusen (13,5 d.p.c.). Die *Adamts16* mRNA-Niveaus wurden durch quantitative RT-PCR gemessen und gegen *Gapdh* normalisiert. Die Messwerte sind Mittelwerte ± SEM von n=9 (*Wt1*^{+/+}), n=12 (*Wt1*^{+/-}) und n=14 (*Wt1*^{-/-}) (**P*<0,05 im Vergleich zum Wildtyp; ANOVA).

4.7.1 *Adamts16*-Expression in *Wt1*^{+/+}-, *Wt1*^{+/-}- und *Wt1*^{-/-}-Mausgonaden

Die Untersuchung von 13,5 Tage alten Gonaden aus *Wt1*^{+/+}-, *Wt1*^{+/-}- und *Wt1*^{-/-}-Mausembryonen zeigte, dass die Menge der *Adamts16*-Transkripte bei einem *Wt1*-Knockout im Vergleich zu der Menge an Transkripten der Wildtypmäuse signifikant verringert war (Abb. 15). Auf Grund der embryonalen Letalität der *Wt1*^{-/-}-Mäuse konnten spätere Entwicklungszeitpunkte nicht untersucht werden. Zudem konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der geringe Gehalt an *Adamts16* mRNA auf die durch das Fehlen von *Wt1* bedingte Apoptose des undifferenzierten Gewebes zurückzuführen war.

4.7.2 Regulatorischer Einfluss eines *Wt1*-Knockdowns auf die *Adamts16*-Expression in murinen embryonalen XY- und XX-Gonadenkulturen

Um trotz der embryonalen Letalität der *Wt1*-defizienten Mausembryonen den Einfluss von *Wt1* auf die *Adamts16*-Expression entwicklungs- und geschlechtsspezifisch zu untersuchen, wurden die Gonaden von Wildtypmäusen zu den Zeitpunkten 11,5 d.p.c.-13,5 d.p.c. explantiert und nach Geschlecht getrennt entweder mit *Wt1* Vivo-Morpholinos oder mismatch Vivo-Morpholinos inkubiert (Abb. 16). Die Verringerung der *Wt1*-Proteinmenge, welche aus der *Wt1* Vivo-Morpholino-induzierten Hemmung der *Wt1*-Translation resultierte, wurde mittels Western Blot belegt (Abb. 16A+B; unten).

Die Ergebnisse der *Adamts16* mRNA-Messungen für die XY-Gonaden ließen deutlich werden, dass zu den frühen Zeitpunkten 11,5 d.p.c. und 12,5 d.p.c. der Knockdown von *Wt1* in einem signifikanten Anstieg der *Adamts16* mRNA resultierte (Abb. 16A). Dieser Effekt trat zum Zeitpunkt 13,5 d.p.c nicht mehr auf. Dort hatte die Hemmung der *Wt1*-Translation keinen Einfluss auf die *Adamts16*-Expression. Die Messergebnisse der in Abbildung 16B dargestellten Experimente mit XX-Gonaden wiesen im Vergleich dazu überraschende Unterschiede auf. Zum Zeitpunkt 11,5 d.p.c. hatte der *Wt1*-Knockdown zunächst keine spezifischen Folgen auf die *Adamts16*-Expression. Erst ab dem Entwicklungszeitpunkt 12,5 d.p.c. führte das Abschalten der *Wt1*-Translation zu einer signifikanten Reduktion der *Adamts16*-Expression.

Darüber hinaus konnte anhand von Untersuchungen der mismatch Vivo-Morpholino-Proben, die ein normales *Wt1*-Expressionsniveau aufwiesen, festgestellt werden, dass das Niveau an *Adamts16*-Transkripten zum Zeitpunkt 13,5 d.p.c im Vergleich zu den früheren Entwicklungszeitpunkten geschlechtsunabhängig, signifikant erhöht war (Abb. 17). Die Graphik zeigt die Ct-Werte von *Adamts16* nach der Normalisierung mit *Gapdh*, wobei eine Einheit jeweils eine Verdopplung der mRNA bedeutet.

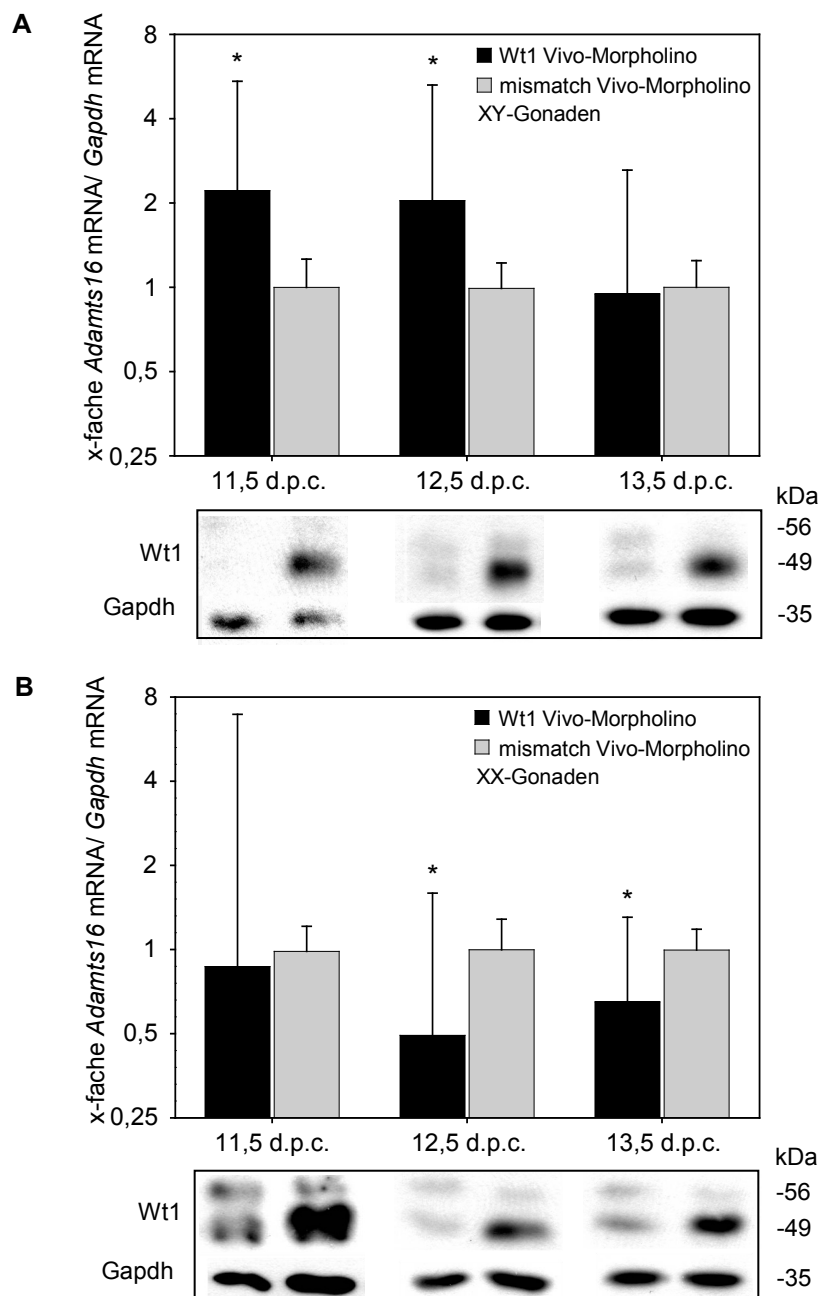


Abbildung 16: Der Knockdown von Wt1 in murinen embryonalen Gonadenkulturen führte bei Männchen zu einem Anstieg der *Adamts16*-Expression zu den frühen Zeitpunkten 11,5 d.p.c. und 12,5 d.p.c, bei Weibchen hingegen zu einer Reduktion der *Adamts16*-Transkripte zu den späteren Zeitpunkten 12,5 d.p.c und 13,5 d.p.c. A, B: Die Balkendiagramme zeigen die Menge an *Adamts16*-Transkripten in männlichen (A) und weiblichen (B) Gonaden (11,5 d.p.c, 12,5 d.p.c. und 13,5 d.p.c), die mit Wt1 bzw. mismatch Vivo-Morpholinos behandelt wurden. Die mRNA-Messungen erfolgten mittels quantitativer RT-PCR, wobei *Gapdh* als Kontrolle diente. Die Messwerte sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils n=12 (* $P < 0,05$; Student's gepaarter *t*-Test). Die Western Blots zeigten Wt1 und Gapdh (Ladekontrolle) zu den verschiedenen Entwicklungszeitpunkten nach der jeweiligen Vivo-Morpholino-Behandlung.

Zum Zeitpunkt 13,5 d.p.c. war im Vergleich sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen die etwa 16-fache Menge an *Adamts16*-Transkripten vorhanden. Ebenfalls basierend auf diesen Messungen konnte konstatiert werden, dass zu allen Entwicklungszeitpunkten die weiblichen Gonadenanlagen im Verhältnis zu den männlichen etwa die doppelte Menge an *Adamts16*-Transkripten exprimierten.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass *Wt1* in den XY-Gonaden zu den frühen Entwicklungszeitpunkten (11,5-12,5 d.p.c.) die *Adamts16*-Expression hemmt, in den XX-Gonaden hingegen eine Aktivierung der *Adamts16*-Expression zu den späteren Zeitpunkten (12,5-13,5 d.p.c.) auslöst. In beiden Geschlechtern erhöht sich die *Adamts16*-Expression zwischen den Entwicklungszeitpunkten 11,5 d.p.c und 13,5 d.p.c. um ein Vielfaches, wobei die XX-Gonaden stets mehr Transkripte aufweisen als die XY-Gonaden.

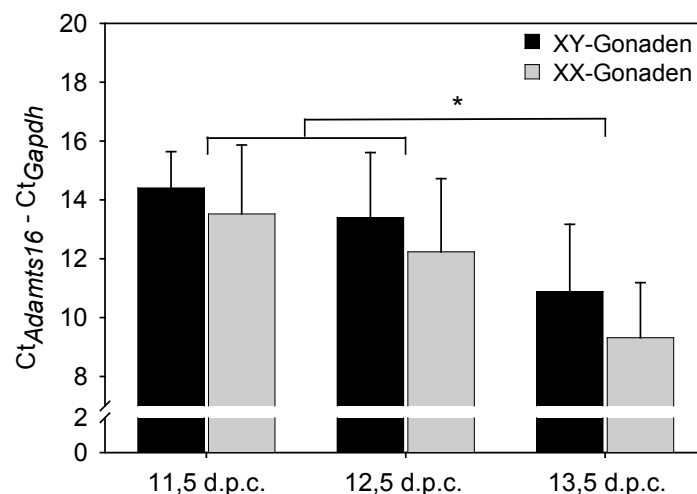


Abbildung 17: Die *Adamts16*-Expression in 13,5 d.p.c. Gonaden war deutlich erhöht im Verhältnis zu früheren Entwicklungszeitpunkten, wobei die XX-Gonaden stets mehr *Adamts16*-Transkripte enthielten als die XY-Gonaden. Dargestellt sind die mit Hilfe von quantitativer RT-PCR ermittelten $Ct_{Adamts16}$ -Werte aus mismatch Vivo-Morpholinos-behandelten XY- und XX-Mausgonaden (11,5 d.p.c, 12,5 d.p.c und 13,5 d.p.c.) nach einer Verrechnung mit den Kontroll- Ct_{Gapdh} -Werten unter Verwendung desselben Thresholds (Schwellenwert) für alle Messungen. Es wird davon ausgegangen, dass jeder Zyklus der PCR mit einer Verdopplung der Amplikonzahl einhergeht. Bei konstantem Schwellenwert besagt dies, dass ein geringerer $Ct_{Adamts16} - Ct_{Gapdh}$ -Wert gleichbedeutend mit einer höheren Ausgangsmenge an *Adamts16* mRNA war. Die Messwerte sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils $n=12$ (* $P<0,05$; ANOVA).

4.8 Adamts16-Lokalisation und Nachweis einer Koexpression mit Wt1 im murinen Herz

Die Befunde der Koexpression und der regulatorischen Zusammenhänge zwischen *Adamts16* und Wt1 in Geweben des Urogenitalsystems warfen die Frage auf, ob auch in anderen, für eine Wt1-Expression bekannten Organen, eine Koexpression und eventuell eine gekoppelte Regulation vorliegen könnte.

Die immunhistologischen Untersuchungen des murinen embryonalen Herzes (Abb. 18) konnten in einer Immuneinzelfärbung zunächst ein ubiquitäres Vorkommen von Adamts16 im Herzmuskel dokumentieren. Die zugehörige Negativkontrolle wies keine Färbung auf. Eine Immundoppelfärbung von Adamts16 und Wt1 zeigte die Koexpression beider Proteine in den als Wt1-Expressionsort bereits bekannten Epikardzellen (28, 133).

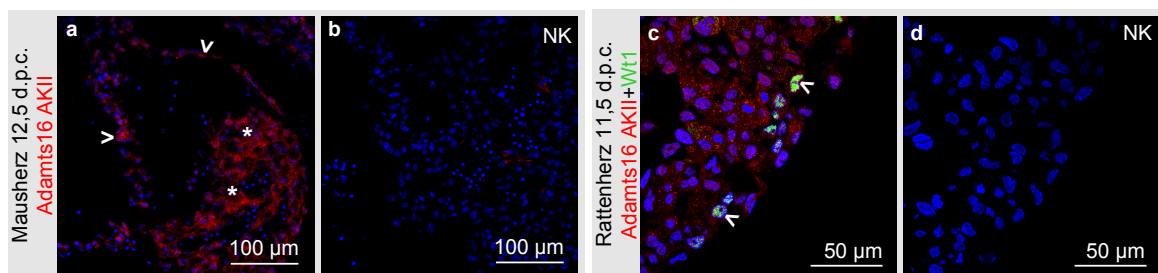


Abbildung 18: Adamts16 konnte im embryonalen Herz sowohl im Myo- als auch im Epikard nachgewiesen werden, wobei in letzterem eine Koexpression mit Wt1 stattfand. Gezeigt sind eine Einzelfärbung (a; NK in b) von Adamts16 (●) mit AKII auf Schnitten eines Mausherzes (12,5 d.p.c.) und eine Doppelfärbung (c; NK in d) von Adamts16 mit AKII und Wt1 (●) auf Schnitten eines Rattenherzes (11,5 d.p.c.). Zellkerne (●); Myokard (*); Epikard (>)

Adamts16 trat im murinen embryonalen Herz weitestgehend Wt1-unabhängig auf. Daher war es umso interessanter zu untersuchen, ob trotz der geringen Kolo-kalisation eine Regulation des *Adamts16*-Gens durch Wt1 vorlag. Expressionsanalysen mit vollständigen embryonalen Herzen aus *Wt1*^{+/+}-, *Wt1*^{+/-}- und *Wt1*^{-/-}-Mausembryonen ergaben, wie in Anbetracht der histologischen Befunde erwartet, keine signifikante Abhängigkeit der *Adamts16*-Expression von Wt1 (Daten nicht gezeigt).

Um die funktionelle Abhängigkeit beider Proteine speziell in den Epikardzellen zu untersuchen, wurde eine primäre Epikardzellkultur angelegt. Die typische, Kopfsteinpflaster-ähnliche Morphologie der Zellen und die stabile Wt1-Expression dienten dabei als Identifikationsmerkmale. Ein durch eine Wt1 Vivo-Morpholino-Behandlung

erzielter Knockdown von Wt1 resultierte in einem signifikanten Rückgang des *Adamts16* mRNA-Niveaus um etwa die Hälfte im Vergleich zu Zellen mit mismatch Vivo-Morpholino-Behandlung (Abb. 19). Der erfolgreiche Wt1-Knockdown konnte mittels Western Blot dokumentiert werden (Abb. 19; unten).

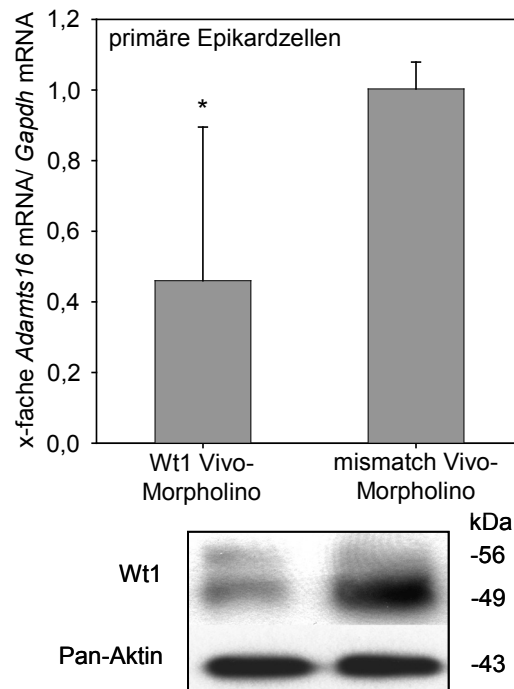


Abbildung 19: Die Inkubation von primären murinen Epikardzellen mit Wt1 Vivo-Morpholinos senkte die Zahl der *Adamts16*-Transkripte. Dargestellt ist die *Adamts16* mRNA-Menge der Epikardzellen, die mit Wt1 Vivo-Morpholinos oder mismatch Vivo-Morpholinos behandelt wurden. Die Quantifizierung der *Adamts16* und *Gapdh* mRNA wurde mittels quantitativer RT-PCR durchgeführt, mit *Gapdh* als Kontrolle. Die Messwerte sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils n=4 (* P <0,05; Student's t -Test). Der Western Blot zeigt Wt1 und Pan-Aktin (Ladekontrolle) nach der jeweiligen Vivo-Morpholino-Behandlung.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die *Adamts16*-Expression im murinen embryonalen Herz ubiquitär ist und, zumindest im Epikard, im Zusammenhang mit der Wt1-Expression steht.

4.9 Molekulare Interaktion des Wilms-Tumor Transkriptionsfaktors mit dem *Adamts16*-Gen

Die Experimente zur Koexpression von *Adamts16* und Wt1 im Urogenitalsystem und im Epikard ließen spekulieren, dass Wt1 die Transkription des *Adamts16*-Gens stimuliert. Aus

diesem Grund wurde sowohl *in silico* als auch *in vitro* und *in vivo* nach Belegen für eine Interaktion des Wt1-Proteins mit dem *Adamts16*-Promotor gesucht.

4.9.1 Identifikation dreier Wt1-Konsensussequenzen vor dem *Adamts16*-Translationsstart *in silico*

Zunächst wurde mit Hilfe von bereits beschriebenen Wt1-Konsensussequenzen (17, 130, 134-136) und den Computerprogrammen MatInspector (© Genomatix Software GmbH) und Targetfinder (© 2012, www.targetfinder.org) nach wahrscheinlichen Wt1-Bindungsstellen im *Adamts16*-Promotor und in der 5'UTR gesucht. Insgesamt konnten dadurch drei potentielle Sequenzabschnitte identifiziert werden, die in dieser Arbeit mit A (Position -43--29), B (Position +51-+66) und C (Position +74-+91) benannt wurden (Abb. 20). Die Bindungsstelle A lag innerhalb des *Adamts16*-Promotors unweit vor dem Transkriptionsstartpunkt +1, wohingegen die Bindungsstellen B und C bereits innerhalb der 5'UTR lagen.

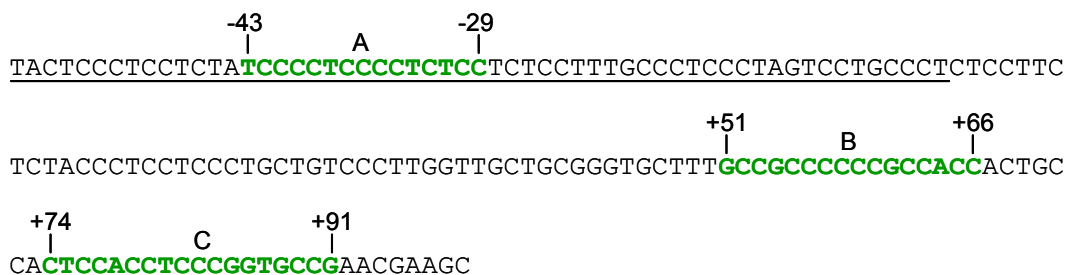


Abbildung 20: Sequenzausschnitt des *Adamts16*-Gens mit Teilen des Promotors bzw. der 5'UTR und drei Wt1-Bindungsstellen. Die drei Wt1-Bindungsstellen A, B und C sind grün und fett gedruckt. Die Lage der endständigen Basen jeder Bindungsstellen ist entsprechend gekennzeichnet. Der dem Promotor zugehörige Sequenzabschnitt ist unterstrichen.

4.9.2 Stimulation des *Adamts16*-Promotors durch Wt1(-KTS)

Zur Feststellung, ob Wt1 tatsächlich den *Adamts16*-Promotor aktiviert, wurde ein Reporterassay auf Basis von Luziferaseaktivitätsmessungen durchgeführt. Dieser ermöglicht es, durch die Messung der Leuchtkraft einer Luziferase (Luc) die Aktivität eines dem *Luc*-Gen vorgeschalteten Promotors zu bestimmen (Abb. 21). Zum Einsatz kamen dabei vier verschiedene Promotor-Reporter-Konstrukte, die jeweils einen kontinuierlich kürzer werdenden Sequenzabschnitt des *Adamts16*-Promotors bzw. der 5'UTR enthielten. Dabei wurde die Länge jedes verwendeten *Adamts16*-Genabschnitts so gewählt, dass zunächst der gesamte Promotor und die 5'UTR im Konstrukt integriert

waren und danach durch drei Verkürzungen jeweils eine prognostizierte Wt1-Bindungsstelle eliminiert wurde. Das kürzeste Konstrukt enthielt lediglich das *Luc*-Gen (Firefly-Luziferase) ohne einen *Adamts16*-Anteil. Für den Reporterassay wurden humane COV434-Granulosazellen verwendet, in die jeweils ein Promotor-Reporter-Konstrukt und ein zur Normalisierung benötigtes Renilla-Luziferase-Konstrukt eingebracht wurden. Ebenfalls kotransfiziert wurden entweder ein Wt1(-KTS)-Expressionsplasmid für eine Wt1(-KTS)-Überexpression oder der entsprechende Leervektor als Negativkontrolle.

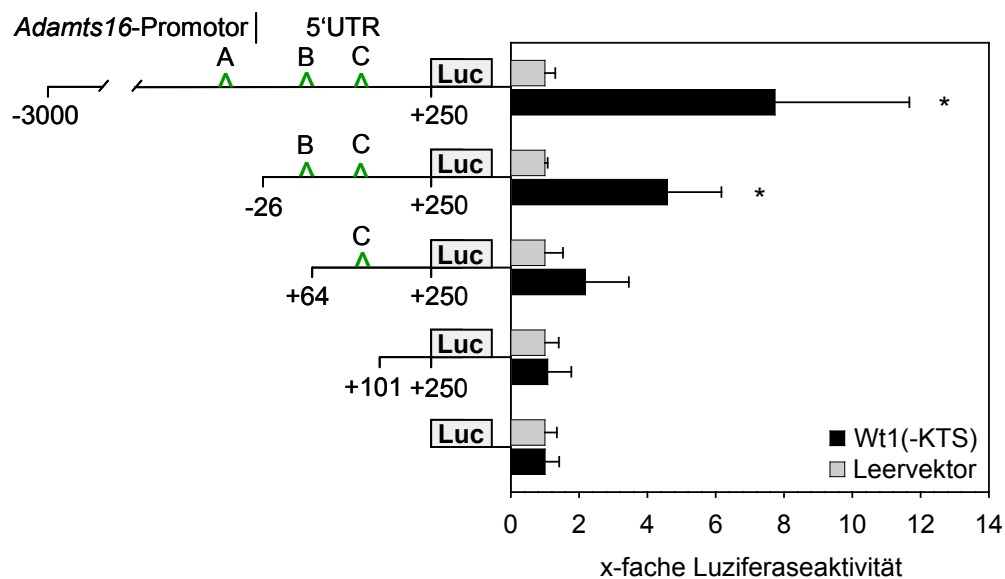


Abbildung 21: Wt1(-KTS) stimulierte den vollständigen *Adamts16* Promotor, wobei die schrittweise Verkürzung des *Adamts16*-Promotors/5'UTR, unabhängig von der Wt1(-KTS)-Expression, zu einer verringerten Luciferaseaktivität führte. Die schematische Darstellung gibt die Länge verschiedener *Adamts16*-Promotor-Reporter-Konstrukte und die relative Lage der prognostizierten Wt1-Bindungsstellen A, B und C an. Das Balkendiagramm stellt die x-fachen Firefly-Luziferaseaktivitäten der verschiedenen Konstrukte in transient transfizierten COV434-Zellen dar. Die Firefly-Luziferaseaktivität wurde mit der Renilla-Luziferaseaktivität normalisiert. Neben dem Promotor-Reporter-Konstrukt und dem Renilla-Luziferase-Konstrukt wurde entweder mit einem Wt1(-KTS)-Expressionsvektor oder als Kontrolle mit dem entsprechenden Leervektor kotransfiziert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von n=4 Experimenten. Die Signifikanzen sind mit Asterisken gekennzeichnet und beziehen sich auf die Transfektion mit dem zu unterst dargestellten Firefly-Reporter-Konstrukt ohne Promotor/ 5'UTR Anteil (* $P < 0,05$; ANOVA).

Als eine Reaktion auf die Wt1(-KTS)-Überexpression kam es durch den vollständigen *Adamts16*-Promotor zu einer beinahe 8-fachen Stimulation der Firefly-Luziferase im Vergleich zur Transfektion mit dem Konstrukt ohne *Adamts16* DNA-Anteil. Ohne eine Wt1(-KTS)-Überexpression zeigten die Messwerte des Konstrukts mit dem vollständigen *Adamts16*-Promotor keine Luciferaseaktivität. Mit dem Wegfall jeder potenziellen

Wt1-Bindungsstelle verringerte sich die Stimulation der Promotoren, bis hin zu einem vollständigen Promotor-Aktivitätsverlust nach der Deletion aller drei WT1-Konsensussequenzen. Bereits die scheinbare Aktivierung des Promotors allein durch die Bindungsstelle C war nicht signifikant im Vergleich zur Transfektion mit dem kürzesten Konstrukt.

Die Experimente zeigen, dass die Expression von Wt1(-KTS) zu einer Stimulation des *Adamts16*-Promotors in humanen Granulosazellen führt, wobei *in vitro* alle drei Wt1-Bindungsmotive für eine vollständige Promotor-Aktivierung benötigt werden.

4.9.3 Bindung von rekombinantem Wt1-Protein an die identifizierten Wt1-Bindungsstellen im *Adamts16*-Gen *in vitro*

Da die Aktivierung des *Adamts16*-Promotors durch eine Wt1(-KTS)-Überexpression bestätigt werden konnte, sollte nun auf molekularer Ebene die Interaktion des Wt1-Proteins mit den einzelnen Bindungsstellen *in vitro* untersucht werden. Die durchgeführten EMSAs dokumentieren, dass das rekombinante Wt1(-KTS)-Protein mit allen drei prognostizierten Wt1-Bindungsstellen (*Adamts16* Oligo *wtA-wtC*) im *Adamts16*-Promotor bzw. der -5'UTR interagieren konnte (Abb. 22A-C). Diese Information ergab sich aus den Retardierungsbanden (Wt1-Shift), die auf eine Bindung des Wt1(-KTS)-Proteins an die 3'DIG-markierten Oligonukleotide zurückzuführen war.

Die gezielten Punktmutationen (Abb. 22E) in den jeweiligen Wt1-Bindungssequenzen (*Adamts16* Oligo *mutA-mutC*) verminderten die Protein-Oligonukleotid-Interaktion in allen drei Fällen erheblich. Gleichermäßen konnte die Bindung von Wt1(-KTS) an die 3'DIG-markierten *Adamts16*-Oligonukleotide durch den Einsatz eines im molaren Überschuss zugegebenen, konkurrierenden, unmarkierten Oligonukleotids des als Wt1-Zielsequenz publizierten *Ntrk2*-Promotors (131) beträchtlich reduziert werden. Das rekombinante Wt1(+KTS)-Protein interagierte nicht mit den identifizierten Wt1-Bindungsstellen (Abb. 22 D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Wt1(-KTS), nicht jedoch Wt1(+KTS), *in vitro* an die *in silico* vorhergesagten Wt1-Bindungsstellen innerhalb des *Adamts16*-Gens bindet.

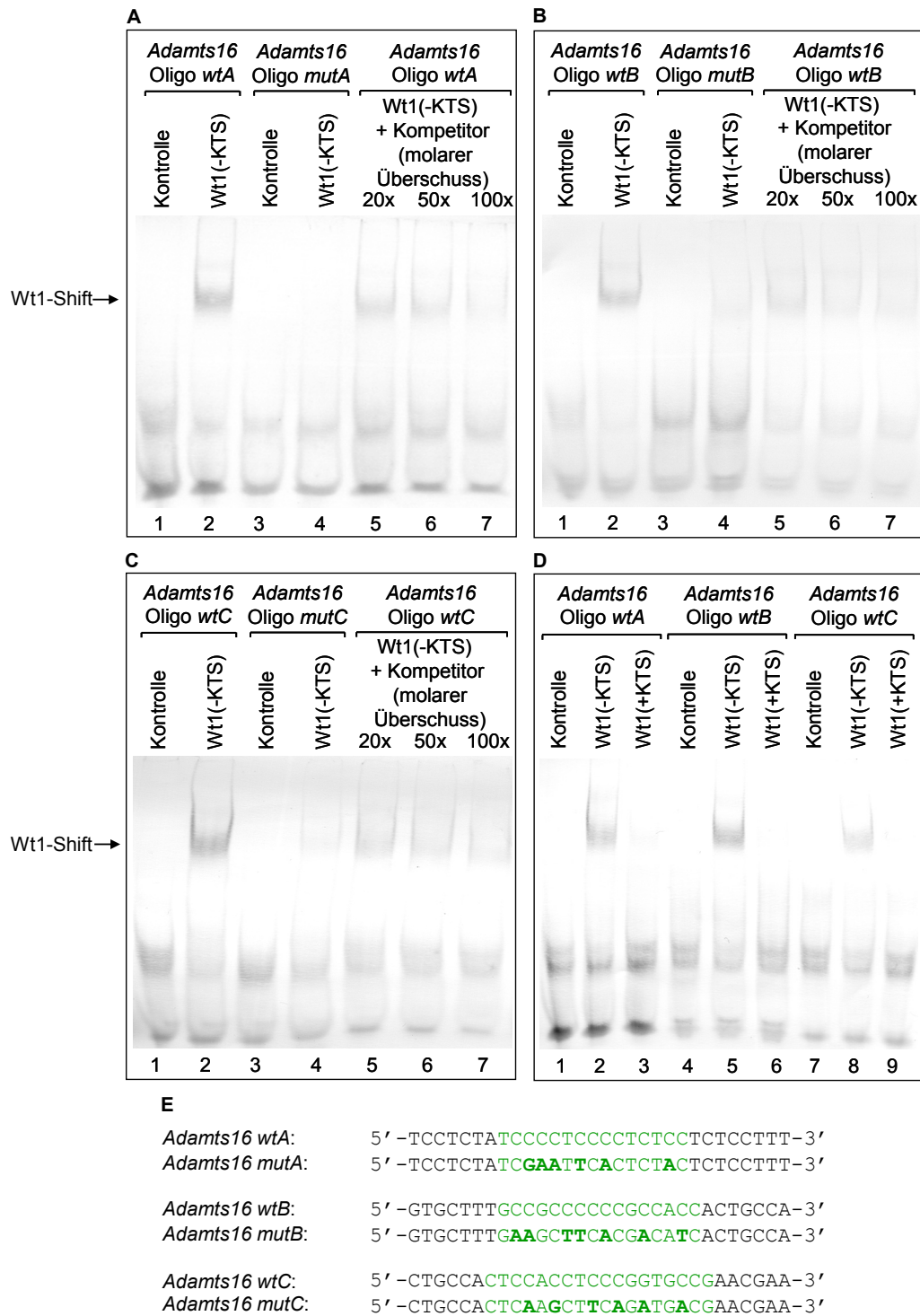


Abbildung 22: Nachweis der *in vitro* Bindung von Wt1(-KTS)-Protein an drei Wt1-Bindungsstellen im Sequenzbereich vor dem Adamts16-Transkriptionsstart durch nicht-radioaktive EMSAs. A-C: Jede Abbildung veranschaulicht das Ergebnis für eine der Wt1-Bindungsstellen A, B oder C, wobei jeweils die ersten beiden Spuren eine Inkubation des 3'DIG-markierten Wildtyp-Oligonukleotids (*Adamts16 wtA-C*) ohne (Spur 1) bzw. mit (Spur 2) rekombinantem Wt1(-KTS) zeigen. In den Spuren 3 und 4 wurde dem entsprechend jeweils das markierte, mutierte Oligonukleotid (*Adamts16 mutA-C*) verwendet. Die Spuren 5-7 zeigen jeweils die Ergebnisse der Kompetition des markierten *Adamts16 wt* Oligonukleotids mit dem unmarkierten Oligonukleotid des *Ntrk2*-Promotors. Die mit „Wt1 Shift“ gekennzeichneten Retardierungsbanden weisen die Bindung des Wt1-Proteins an die markierten Oligonukleotide nach.

D: Vergleich der Bindungen der Wt1(-KTS)- (Spuren 2, 5 und 8) und der Wt1(+KTS)-Isoform (Spuren 3, 6 und 9) an die *Adamts16 wt* Oligonukleotide. *E*: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide. Die Wt1-Bindungsstellen und ihre korrespondierenden mutierten Sequenzen sind grün markiert. Punktmutationen sind fett gedruckt.

4.9.4 Bindung von Wt1 an die *Adamts16*-Promotor/5'UTR-Region *in vivo*

Um festzustellen, ob Wt1 nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* an das *Adamts16*-Gen bindet, wurde zunächst mit M15-Zellen eine ChIP durchgeführt. Die Abbildung 23A gibt eine schematische Übersicht über die Lage der zuvor identifizierten Wt1-Bindungsstellen im *Adamts16*-Gen und die Positionen der verwendeten PCR-Primer. Diese umschlossen einen insgesamt 291 bp langen Abschnitt aus Teilen der *Adamts16*-Promotorsequenz und der 5'UTR, der alle zuvor lokalisierten Wt1- Bindungsstellen (A-C) beinhaltete. Die Präzipitation unter Verwendung eines Wt1-Antikörpers erzielte eine signifikante Anreicherung (etwa 2,5-fach) der *Adamts16*-DNA im Vergleich zur Verwendung von Kaninchen-IgG als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich die präzipitierte Menge des bereits beschriebenen Wt1-Zielgens *Amhr2* untersucht (137). Die Menge an *Amhr2*-DNA war nach der Fällung mit dem Wt1-Antikörper ebenfalls signifikant erhöht, jedoch in geringerem Ausmaß als die *Adamts16*-DNA. Die als Negativkontrolle verwendeten *Aktin*-Primer führten, wie erwartet, nicht zu einer DNA-Anreicherung mit dem Wt1-Antikörper (Abb. 23B).

Die Inkubation mit einem Histon-Antikörper, der sämtliche DNA-Bereiche gleichermaßen anreichern sollte, führte zu einer gleichmäßig starken, signifikanten DNA-Anreicherung aller drei Gene im Vergleich zur Negativkontrolle. Da in den M15-Zellen die Unterscheidung der Bindung der verschiedenen Wt1-Isoformen an die DNA nicht möglich war, wurden weitere ChIPs mit den Wt1(-KTS)- bzw. Wt1(+KTS)- exprimierenden UB27- bzw. UD28-Zellen durchgeführt (Abb. 23C+D). Durch das eingebaute Tet-Off System konnte in beiden Zelllinien eine gezielte Induktion der Wt1-Expression erreicht werden. Unter Verwendung eines Wt1-Antikörpers wurde vergleichend in nicht-induzierten und induzierten Zellen präzipitiert. Nach einer induzierten Überexpression von Wt1(-KTS) in UB27-Zellen konnte im Vergleich zu nicht induzierten Zellen eine signifikante Zunahme (etwa 3-fach) der präzipitierten *ADAMTS16*-DNA verzeichnet werden. Das gleich bleibende Niveau an *AKTIN*-DNA bestätigte den Einsatz gleicher Ausgangszellmengen. Bei der Überexpression von Wt1(+KTS) konnte anhand fehlender DNA-Anreicherung keine Bindung des Wt1(+KTS)-Proteins an die *ADAMTS16*-Promotorregion nachgewiesen werden. Auch hier blieb das *AKTIN*-DNA-Niveau mit und ohne Induktion gleich.

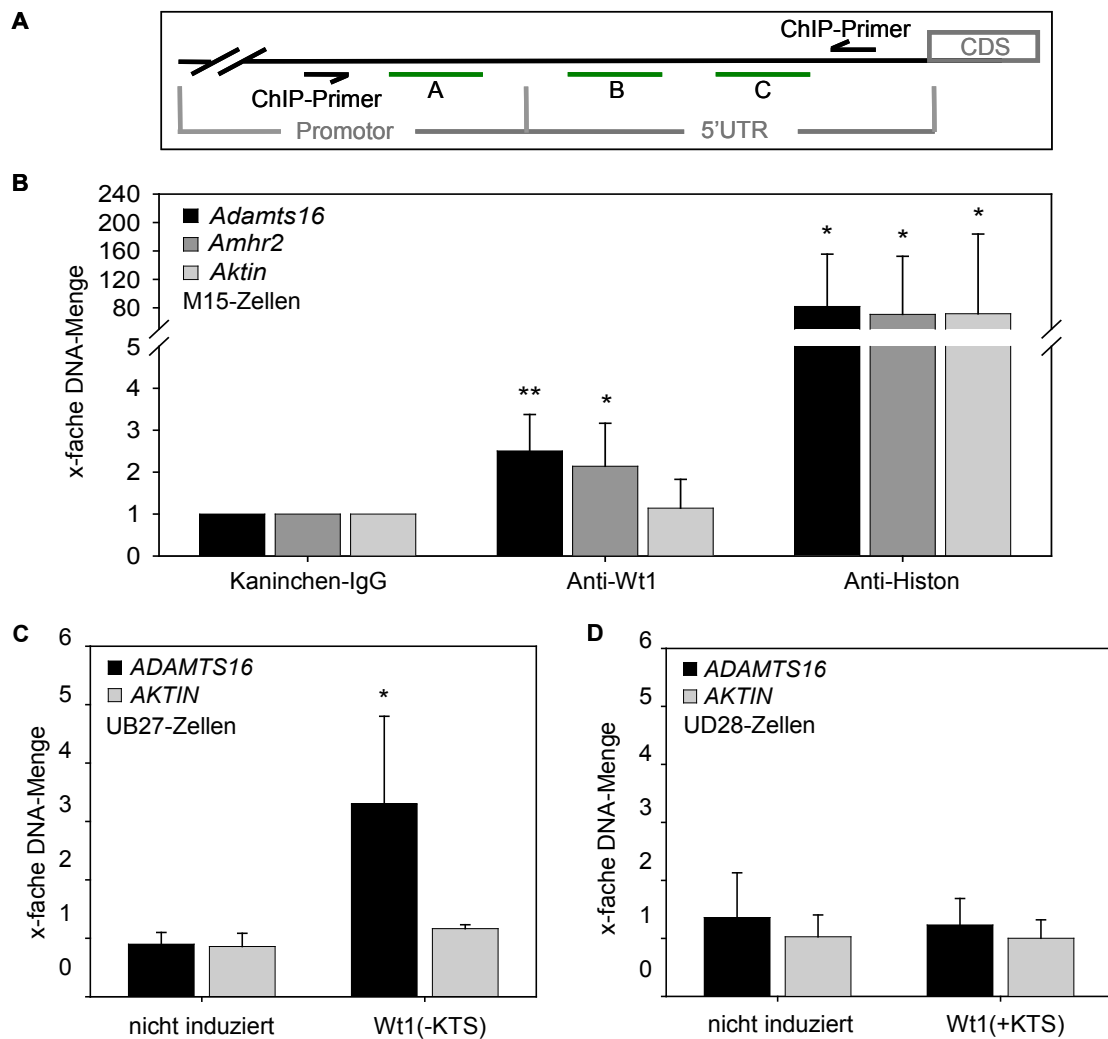


Abbildung 23: Nachweis der *in vivo* Bindung von Wt1(-KTS), nicht aber Wt1(+KTS), an den *Adamts16*-Promotor bzw. die -5'UTR mittels ChIP. *A*: Schematische Übersicht des Bereichs vor dem *Adamts16*-Translationsstart. Die Pfeile geben die Lage der für die quantifizierenden PCR verwendeten Primer an. Wt1-Bindungsstellen (A, B, C); coding DNA sequence (CDS) *B*: Dargestellt sind die relativen, angereicherten DNA-Mengen von *Adamts16*, *Amhr2* und *Aktin* nach der Fällung der Protein-DNA-Crosslinkmoleküle mit Wt1-Antikörper, Histon-Antikörper oder Kaninchen IgG. Für die Auswertung wurde von einem DNA-Input von 100 % ausgegangen und die prozentuale Anreicherung in jeder Probe im Vergleich zum Input ermittelt. Der prozentuale Anteil, der unter Einsatz von Kaninchen-IgG präzipitierten Probe, wurde als 1-fache Anreicherung definiert und die übrigen Werte im Verhältnis dazu dargestellt. Die Quantifizierung der DNA erfolgte mittels quantitativer RT-PCR, wobei *Aktin* als Negativkontrolle und *Amhr2* als Positivkontrolle fungierten. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD von n=4 dargestellt (* P <0,05; ** P <0,01; Student's *t*-Test). *C*, *D*: Gezeigt sind die präzipitierten DNA-Mengen von *ADAMTS16* und *AKTIN* aus den humanen UB27- (*C*) bzw. UD28-Zellen (*D*). Es sind jeweils nicht induzierte Zellen im Vergleich zu Wt1-überexprimierenden Zellen dargestellt (Wt1(-KTS) in UB27 bzw. Wt1(+KTS) in UD28). Die DNA wurde mittels quantitativer RT-PCR gemessen, wobei *AKTIN* als Negativkontrolle diente. Die Messwerte sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils n=3 (* P <0,05; Student's *t*-Test).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der vor dem Startcodon liegende Sequenzbereich des *Adamts16*-Gens drei *cis*-Elemente enthält, an die der Wilms-Tumor Transkriptionsfaktor *in vitro* und *in vivo* binden kann. In *in vitro* Versuchen mit einer Granulosazelllinie führt diese Interaktion zu einer Stimulation der *Adamts16*-Promotoraktivität.

5 DISKUSSION

5.1 Molekulare Voraussetzungen für eine Regulation der *Adamts16*-Expression durch den Wilms-Tumor Transkriptionsfaktor

5.1.1 Wt1(-KTS) interagiert *in vitro* mit drei Bindungsmotiven im *Adamts16*-Gen

Die DNA-Microarray-Analyse (vgl. Kap. 4.1) kann *Adamts16* zwar als potentielles Wt1-Zielgen ausmachen, die Daten eines solchen Experiments sollten jedoch durch weiterführende Experimente verifiziert werden. Die in diesem Zusammenhang mit drei variierenden Zellhintergründen durchgeführten, Wt1(-KTS)-abhängigen *Adamts16*-Expressionsanalysen bestätigen die Microarray-Daten und die Aktivierung des *Adamts16*-Promotors durch den Wilms-Tumor Transkriptionsfaktor (vgl. Kap. 4.2).

Eine Voraussetzung für die Regulation eines Gens durch einen Transkriptionsfaktor ist das Vorliegen einer Koexpression beider Proteine. Die in dieser Arbeit erlangten histologischen Expressionsdaten von Wt1 und *Adamts16*, die in mehreren Organen eine Koexpression von Wt1 und *Adamts16* belegen, bieten eine erste Grundlage für einen regulatorischen Zusammenhang (vgl. Kap. 4.3 und 4.6). Eine weitere, auf molekularer Ebene basierende Voraussetzung für die Expression des *Adamts16*-Gens in direkter Abhängigkeit des Wilms-Tumor Transkriptionsfaktors beinhaltet das Vorhandensein von spezifischen Wt1-Bindungsmotiven im *Adamts16*-Gen. Es konnten bereits mehrere *cis*-Bindungselemente für die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Egr1 im proximalen *ADAMTS16*-Promotor identifiziert werden (124). Der GC-Reichtum in diesem Abschnitt ließ Surridge *et al.* (124) bereits vermuten, dass das Spektrum der interagierenden Transkriptionsfaktoren in diesem Bereich weitaus umfangreicher sei. Anhand der *in silico* Untersuchungen konnten drei Wt1-Konsensussequenzen innerhalb des *Adamts16*-Gens der Maus identifiziert werden, die unweit des Transkriptionsstarts in einem GC-reichen Sequenzabschnitt liegen (s. Abb. 20). Vergleiche mit dem humanen *ADAMTS16*-Gen zeigen exakt in diesen Regionen eine Sequenzhomologie von durchschnittlich 80 %; die Sequenzen von Maus und Ratte weisen sogar eine mittlere Homologie von 92 % auf (Daten nicht gezeigt). Diese hohe Konservierung und die Fähigkeit der Wt1(-KTS)-Isoform *in vitro* an alle drei Wt1-Konsensussequenzen zu binden unterstreichen die

Authentizität der Bindungsstellen und zeigen erstmalig die direkte Interaktion von Wt1(-KTS) mit dem *Adamts16*-Gen (s. Abb. 22).

Der Wt1(+KTS)-Isoform wird bisher eine Rolle bei der posttranskriptionellen Regulation zugeschrieben (20), wobei der aktuelle Wissensstand nur unzureichende Funktionsbeschreibungen zulässt. Wie erwartet kann Wt1(+KTS) durch die drei zusätzlich inserierten Aminosäuren nicht an die identifizierten Wt1-Bindungsstellen binden. Konform dazu sind die Ergebnisse der Expressionsanalysen in 293-Zellen und Osteosarkomzellen, in denen nur die Überexpression der Wt1(-KTS)-Isoform eine Anreicherung der *Adamts16* mRNA herbeiführt (vgl. Kap. 4.2). Anhand dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die Wt1(+KTS)-Isoform nicht an einer direkten transkriptionellen Regulation des *Adamts16*-Gens beteiligt ist. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass Wt1(+KTS) im späteren Verlauf, beispielsweise bei der Translationskontrolle von *Adamts16*, mitwirkt.

5.1.2 Wt1(-KTS) bindet *in vivo* an das *Adamts16*-Gen

Bezogen auf die Bindungsfähigkeit der Wt1-Isoformen, entsprechen die Ergebnisse der ChIP-Analysen denen der *in vitro* Versuche. Die Zellen mit einer Wt1(-KTS)-Überexpression zeigen einen signifikant höheren Anteil an *Adamts16*-Promotor/5'UTR-DNA im Präzipitatgemisch als die Zellen mit einer Wt1(+KTS)-Überexpression (s. Abb. 23). Generell belegen die ChIP-Analysen, dass die direkte Interaktion zwischen *Adamts16*-Promotor und Wt1(-KTS)-Protein auch *in vivo* stattfindet. Die Tatsache, dass in M15-Zellen die Präzipitation der *Adamts16* DNA ergiebiger war als die DNA-Präzipitation des bereits beschriebenen Zielgens *Amhr2* (137), impliziert eine hohe Affinität des Wt1-Proteins zum *Adamts16*-Gen. Diese wird auch durch das Konkurrenzverhalten im Zusammenhang mit der *Ntrk2*-Oligonukleotid-Zugabe in den EMSAs bekräftigt (vgl. Kap. 4.9.3). Das unmarkierte *Ntrk2*-Oligonukleotid, welches als eine Wt1(-KTS)-Zielsequenz bekannt ist (131), kann auch bei einem 100-fachen Überschuss nicht sämtliche Wt1(-KTS)-Moleküle binden und die Ausbildung der Wt1-Shift-Bande vollständig unterdrücken. Eine falsch positive Bindung des Wt1(-KTS) an die drei *Adamts16*-Oligonukleotide ist unwahrscheinlich. Nach der schrittweisen Erhöhung der Konzentration des unmarkierten *Ntrk2*-Oligonukleotids erfolgt eine kontinuierliche Abschwächung der Wt1-Shift-Banden und die Bindung von Wt1(-KTS) kann mit nur wenigen Punktmutationen innerhalb der *Adamts16*-Oligonukleotide beinahe komplett aufgehoben werden.

5.1.3 Vollständige *in vitro* Promotoraktivierung benötigt alle drei Wt1(-KTS)-Bindungsstellen

Die Befunde des Reporterassays belegen, dass für eine vollständige *in vitro* Stimulation des *Adamts16*-Promotors in humanen Granulosazellen die Belegung aller drei Wt1(-KTS)-Bindungsstellen obligatorisch ist. Bei einem Fehlen der Bindungsstellen A und B erfolgt zwar eine leichte Stimulation des Promotors, die maximale Anregung tritt jedoch nur bei Anwesenheit aller drei ein (s. Abb. 21).

Einen ersten Aufschluss über die Fähigkeit zur Promotoraktivierung der einzelnen Bindungsstellen unabhängig voneinander könnte die Durchführung weiterer Reporterassays mit Promotor-Reporter-Konstrukten geben, die jeweils durch Punktmutationen zwei inaktivierte Bindungsstellen besitzen. Weitaus interessanter wäre eine *in vivo* Untersuchung im natürlichen genetischen Umfeld, die durch eine Generierung von *LacZ*-Knockin-Mäusen mit mutierten Wt1-Bindungsstellen im *Adamts16*-Gen möglich wäre. Die Analyse der *Adamts16*-Promotoraktivität könnte in diesem Fall über eine Messung der β -Galaktosidaseaktivität erfolgen.

5.2 Wt1-abhängige *Adamts16*-Expression und mögliche Funktionen von *Adamts16* in Urogenitalsystem und Epikard

5.2.1 Die Metalloproteinase *Adamts16* als entwicklungsrelevanter Faktor in der embryonalen Niere und ihre mögliche Funktion in der adulten Niere

Die auf molekularer Ebene und in Zellkulturexperimenten nachgewiesene transkriptionelle Regulation des *Adamts16*-Gens durch den Wilms-Tumor Transkriptionsfaktor kann von großer Bedeutung sein. Die Wt1-Expression ist in einigen Organen essentiell, beispielsweise in der Niere, wobei bisher nicht alle Wt1-gesteuerten Prozesse bekannt sind. Die Immunfärbungen weisen beide Proteine in den sich entwickelnden bzw. ausdifferenzierten Glomeruli der Niere nach (vgl. Kap. 4.3). In der Nierenentwicklung ist Wt1 ein wesentlicher Faktor, der in der Nachniere an der Steuerung der MET des metanephrogenen Blastems beteiligt ist (26, 40). Für diesen und andere Entwicklungsprozesse in der Niere und weiteren Organen werden Metzinkine, bisher vor allem die MMPs, als essentiell angesehen. Besonders bei morphologischen Umstrukturierungen, wie dem Aussprossen einer Organanlage oder anderen Vorgängen, die MET oder EMT involvieren, ist ein Umbau der EZM notwendig (138). Bisher sind

bereits mehrere Mmps und ihre Inhibitoren sowohl zeitlich als auch örtlich differenziert exprimiert und an der Nephrogenese beteiligt (139). In *Mmp9*-defizienten Mäusen wird beispielsweise die Tyrosinkinase c-Kit (Stammzellfaktor-Rezeptor) nicht aktiviert, was letztendlich durch eine Förderung der Apoptose zu einer deutlich verringerten Anzahl an Nephronen führt (140). Auch die Metalloproteinase Adam10 konnte in der embryonalen Ureterknospe lokalisiert werden, wo sie vermutlich an der Signaltransduktion über den Delta-Notch-Signalweg beteiligt ist (141). Darüber hinaus werden Adamts9 und Adamts1 in der murinen embryonalen Niere exprimiert. Adamts1 spaltet Versikan, ein Proteoglycan, dessen erhöhtes Vorkommen in der Niere zu einer chronischen Proteinurie führt (142). In *Adamts1*-defizienten Mäusen bildet sich zwar eine Niere aus, diese ist jedoch durch ein unterentwickeltes Nierenparenchym und vergrößerte Nierenkelche gekennzeichnet (143, 144). Angesichts des breiten Funktionsspektrums der Metzinkine während der Nierenentwicklung ist anzunehmen, dass Adamts16 sowohl direkt am Gewebeumbau beteiligt sein könnte, als auch an den entsprechenden Signaltransduktionswegen.

In dieser Arbeit wird nachgewiesen, dass der Knockdown von Adamts16 zum Zeitpunkt 12,5 d.p.c. zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Aussprossung des Ureters führt. Die Immunfärbungen beschreiben Adamts16 zu späteren embryonalen Zeitpunkten (14,5 d.p.c. und 16,5 d.p.c.) und in der adulten Maus erstmals in den Podozyten der Glomeruli (vgl. Kap. 4.3). Diese Erkenntnis gibt Anlass zu der Spekulation, ob Adamts16 im adulten Tier eine Funktion in den Glomeruli hat, die sich auf die Filtrationseigenschaften auswirkt. Diese Theorie wird durch kürzlich publizierte Befunde eines *Adamts16*-Knockdowns in adulten Dahl Salt-sensitive Ratten gestützt (145), in denen der Verlust an Adamts16 mit einer ausgeprägten Proteinurie assoziiert wurde. Die genetisch veränderten Ratten wiesen verdickte und teilweise gespaltene glomeruläre Kapillaren auf. Zusätzlich wurde eine signifikante Reduktion des arteriellen Blutdrucks festgestellt (145). Diese Schäden sprechen für eine wichtige Funktion von Adamts16 innerhalb der Glomeruli, zumindest bezogen auf das Rattenmodell mit genetisch bedingtem Bluthochdruck.

Unlängst wurde in der adulten murinen Niere eine funktionelle und morphologische Relevanz von Wt1 festgestellt (33). Ein gezielter, Tamoxifen-induzierter Wt1-Knockdown in adulten Mäusen verursachte eine erhebliche Proteinurie, wobei sich nach einem Verlust der Fußfortsätze der Podozyten langsam eine generelle Degradation der Glomeruli vollzog. Es konnte festgestellt werden, dass sowohl die Synaptopodin- als auch die Nephrinexpression beinahe vollständig gehemmt waren (33). Nephrin ist ein Hauptbestandteil der Schlitzmembran, welche ein Teil der Blut-Harn-Schranke ist. Im

Rahmen meiner Arbeit wurde ein *Wt1* Vivo-Morpholino-Knockdown in embryonalen Nierenexplantaten durchgeführt, der eine deutliche Reduktion der *Adamts16* mRNA nach sich zog (vgl. Kap. 4.4). Betrachtet man die bisher bekannten Fakten und die eigenen Ergebnisse, so lässt sich vermuten, dass eine verminderte podozytäre Expression von *Adamts16* zu den phänotypischen Veränderungen der Tamoxifen-induzierten *Wt1*-Knockoutmäuse beitragen könnte.

Für weitere Betrachtungen hinsichtlich der funktionellen Analyse von *Adamts16* wäre es interessant, die Nierenexplantate nach einem *Adamts16* Vivo-Morpholino-Knockdown auf Veränderungen in der Expression von MET-Markern wie beispielsweise E-Cadherin zu untersuchen. E-Cadherin ist ein Adhäsionsprotein welches die Zell-Zell-Kontakte stabilisiert und normalerweise nicht von mesenchymalen Zellen exprimiert wird (146, 147). Bisher konnte eine Beeinträchtigung der Ureterverzweigung durch einen *Adamts16*-Knockdown in der embryonalen Niere festgestellt werden. Die Analyse der MET-Marker-Expression könnte einen Aufschluss über die direkte Beteiligung von *Adamts16* an der MET geben, bei der auch *Wt1* in der embryonalen Niere eine essentielle Rolle spielt (38-40). Auch die Herstellung einer Zucht heterozygoter *Adamts16*-Knockoutmäuse wäre von großem Interesse, da an diesen Tieren die Folgen eines hetero- bzw. homozygoten Knockouts *in vivo* deutlich werden würden und die phänotypische Relevanz der *Adamts16*-Expression, unabhängig von dem bereits bestehenden Bluthochdruck-Rattenmodell, gezeigt werden könnte. Ebenso könnten vergleichende mRNA-Quantifizierungen aus adulten Nieren konditioneller *Wt1*-Knockoutmäuse, wie im Fall von Nephron und Synaptopodin, Aufschluss über die *Wt1*-abhängige *Adamts16*-Expression in der adulten Niere geben.

5.2.2 Geschlechtsspezifische und entwicklungsabhängige Expressionsregulation von *Adamts16* durch *Wt1* in embryonalen Gonaden

Einen interessanten Aspekt im Hinblick auf die *Wt1*-bedingten Regulation des *Adamts16*-Gens und die möglichen Funktionen der Metalloproteinase stellt auch die Untersuchung der Gonaden dar. *Wt1* nimmt dort eine maßgebliche Rolle bei der Reifung der indifferenten Gonadenanlage und der anschließenden Geschlechtsdifferenzierung ein (27, 48, 57).

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass ein *Wt1*-Knockdown in männlichen *ex vivo* Gonadenkulturen zu einer verstärkten *Adamts16*-Expression zu Beginn der Geschlechtsdifferenzierung (11,5 d.p.c. und 12,5 d.p.c.) führt. Im Gegensatz dazu erfolgt in

XX-Gonaden aus 12,5 d.p.c. und 13,5 d.p.c. Embryonen nach einer *Wt1*-Translationsinhibition eine Absenkung der *Adamts16*-Expression (s. Abb. 16). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass *Adamts16* in den Gonadenanlagen der Maus sowohl geschlechtsspezifisch als auch zeitabhängig reguliert wird. Möglicherweise hemmt *Wt1* die *Adamts16*-Expression in XY-Gonaden zu Beginn der Differenzierung, hingegen aktiviert es die *Adamts16*-Expression in XX-Gonaden zu fortgeschrittenen Zeitpunkten. Letztere Erkenntnis wird auch durch das Ergebnis des Reportergenassays unterstützt, der in der Granulosazelllinie COV434 nach einer *Wt1*(-KTS)-Überexpression eine Aktivierung des *Adamts16*-Promotors erkennbar werden lässt (s. Abb. 21). Auch die Daten der Immunfärbungen der embryonalen Gonaden befürworten diese Theorie. In den XY-Gonaden konnte keine signifikante Koexpression detektiert werden, die XX-Gonaden zeigten jedoch teilweise eine Überlappung im Expressionsmuster von *Adamts16* und *Wt1* (s. Abb. 13+14). Die duale Regulation eines Gens durch einen Transkriptionsfaktor konnte für *Wt1* bisher nicht nachgewiesen werden, es sind jedoch bereits Beispiele einer solchen Regulationsweise bekannt. Eines ist der Transkriptionsfaktor SP1, welcher das humane folate receptor 3-Gen (*FOLR3*) durch die Bindung verschiedener SP1-Bindungsstellen im *FOLR3*-Promotor reprimieren oder aktivieren kann (148). Eine duale Regulation kann jedoch nicht nur durch verschiedene Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen gesteuert werden, sondern u.a. auch durch eine Modulation der Konzentration des Transkriptionsfaktors, eine gewebespezifische posttranskriptionelle Modifikation oder eine Interaktion des Transkriptionsfaktors mit verschiedenen Kofaktoren. Eine Kofaktor-gesteuerte, duale Regulation wäre auch für das *Adamts16*-Gen denkbar, da für *Wt1* bereits Kofaktor-bedingte Signalwege nachgewiesen werden konnten. In der Gonade interagiert *Wt1* z.B. mit dem Transkriptionsfaktor steroidogenic factor 1 (Sf1, nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1 (Nr5a1)) und dem Koaktivator Fhl2 (four and a half LIM domain protein) und kann dadurch die Expression des *Amh*-Gens regulieren (149).

Die Ergebnisse der geschlechtsunabhängigen mRNA-Quantifizierung in embryonalen *Wt1*^{+/+}- und *Wt1*^{-/-}-Gonadenanlagen scheinen zunächst kontrovers zu den *ex vivo* Versuchen (s. Abb. 15). Sie lassen sich jedoch durch die unterschiedliche Morphologie der *Wt1*^{+/+}- und *Wt1*^{-/-}-Gonadenanlagen erklären. Die embryonalen *Wt1*-Knockoutmäuse weisen im Vergleich zu Wildtypmäusen einen erheblich verdickten Mesonephros auf, wohingegen die anliegende Gonade sehr stark verkleinert ist. Hinzu kommt, dass die *Adamts16*-Expression in den XY-Gonaden zum Entwicklungszeitpunkt 13,5 d.p.c. keine *Wt1*-Abhängigkeit aufweist und die Experimente ohne eine vorherige

Geschlechtsbestimmung durchgeführt wurden. Berücksichtigt man diese beiden Umstände, sind die Daten durchaus verständlich.

Wie die Immunfärbungen verdeutlichen, ist Adamts16 in den embryonalen Gonaden auch nukleär lokalisiert. Es scheint sich bei den betroffenen Zellen um die Keimzellen zu handeln, da sie sich innerhalb der Keimstränge bzw. Eiballen befinden und die großen, runden Kerne die typische Morphologie aufweisen (s. Abb. 13+14). Bisher wurde angenommen, dass die Adamts stets sezerniert werden (106), allerdings konnte neueren Erkenntnissen zur Folge zumindest Adamts5 bereits intrazellulär lokalisiert werden. Es ist in Chondrozyten für die Prozessierung von Matrilin4 verantwortlich (150), einem sogenannten Adapter-Protein der EZM (151). Adamts16 könnte also weitaus vielfältigere Aufgaben haben, die nicht zwingend eine direkte Interaktion mit der EZM involvieren würden und zusätzlich, zumindest bezogen auf die Expression in den embryonalen Gonaden, teilweise Wt1-unabhängig ablaufen könnten.

Adamts16 scheint außerdem im Laufe der Gonadenentwicklung mehrere oder wechselnde Funktionen zu haben. Die nukleäre Adamts16-Lokalisation ist in dieser Arbeit auf die embryonalen Gonaden beschränkt (s. Abb. 13+14), stattdessen ist die Lokalisation in den adulten Gonaden (s. Abb. 11+12) stets extranukleär. Im Testis vollzieht sich dieser Wandel wahrscheinlich während der Differenzierung der Keimzellen zu Spermatogonien und der Ausdifferenzierung der Hodenkanälchen, da die aus den Keimzellen hervorgehenden Spermatogonien im adulten Testis weder nukleäres noch extranukleäres Adamts16 aufweisen. Interessant wäre in diesem Zusammenhang eine Reihe von Adamts16-Immunfärbungen sämtlicher, zeitlich dicht folgender Entwicklungsstadien des Testis. Diese könnten einen besseren Aufschluss über den genauen Zeitpunkt des Lokalisationswechsels geben.

5.2.3 Adamts16 in der Spermatogenese

Bei der Betrachtung des adulten Testis fällt auf, dass der Großteil an Adamts16 in unmittelbarer Nähe der elongierten Spermatiden lokalisiert ist. Zusätzlich wird die Metalloproteinase in den Spermatozyten produziert (s. Abb. 11). Die Metzinkine, davon bisher u.a. 18 Vertreter der ADAM, nehmen während der gesamten Spermatogenese und der nachfolgenden Befruchtung der weiblichen Oozyte zahlreiche wichtige Funktionen ein (77, 152). Ein Komplex aus Adam2 und Adam3 hat sich beispielsweise in der Vergangenheit als essentiell für die Eizell-Spermium-Interaktion herausgestellt (153) und im Mausmodell wird die Mmp2 für die migrationsbedingte Degradation der EZM während

der Spermienreifung benötigt (154). Ähnliche Aufgaben, wie eine mögliche Rolle bei der Wanderung der reifenden Keimzellen in das innere des Samenkanals oder einer Funktion bei der Ablösung des fertigen Spermiums und der weiteren Migration innerhalb der adulten Geschlechtsapparate könnten auch *Adamts16* zugeordnet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedoch zu diesem Zeitpunkt nur Spekulationen zu. In diesem Zusammenhang wäre es von Interesse, Whole-Mount-Immunfärbungen des Nebenhodens bzw. des Samenleiters anzufertigen, welche Aufschluss über die weiterführende *Adamts16*-Expression in abgelösten Spermien geben könnten. Ebenso von Bedeutung könnte ein *Adamts16* Vivo-Morpholino-Knockdown in *ex vivo* Gonadenkulturen sein, da dieser mögliche Defizite einer *Adamts16*-defizienten Gonadenentwicklung aufzeigen könnte. Besonders von Interesse wäre nachfolgend auch eine Untersuchung von hetero- und homozygoten *Adamts16*-Knockouttieren. Diese könnten zusätzlich Aufschluss über die Notwendigkeit von *Adamts16*, beispielsweise im Bezug auf die Fertilität, bieten. Von Gopalakrishnan *et al.* (145) wurde zwar bereits ein *Adamts16*-Knockdown in Dahl Salt-sensitive Ratten durchgeführt, Aussagen über die Fertilität der Tiere wurden jedoch nicht publiziert. Als eine Alternative zu homozygoten *Adamts16*-Knockouttieren wäre die Generierung konditioneller *Adamts16*-Knockouttiere sinnvoll, da diese das gezielte Abschalten des Gens in bestimmten Organen bzw. zu bestimmten Zeitpunkten zulassen würden. Derartige Modelle würden die differenzielle Untersuchung angeborener und adult erworbener Funktionsveränderungen, die durch das Fehlen von *Adamts16* bedingt sind, erlauben.

Als kontrovers stellt sich in den Immunfärbungen des adulten Testis die Expression des Wt1-Proteins dar. Entgegen der bisher in der Fachliteratur publizierten Eigenschaft als Sertoli-Zellmarker (52, 155), wird Wt1 in dieser Arbeit in Abhängigkeit vom Spermatogenesestadium zusätzlich in den Spermatozyten des adulten Rattentestis detektiert (s. Abb. 11). Erste Veröffentlichungen beschreiben Wt1 zwar bereits in den Keimzellen (50, 156), sie beziehen sich dabei jedoch u.a. auf die embryonale Maus. Dies steht wiederum mit den Ergebnissen dieser Arbeit in Konflikt, denn es konnte keine Wt1-Immunfärbung in den embryonalen Keimzellen der Maus nachgewiesen werden. Da nicht bekannt ist, in welchen Mengen Wt1 in den Keimzellen exprimiert werden soll und die Daten der erwähnten Veröffentlichungen (50, 156) nicht auf Immunfärbungen von Kryoschnitten beruhen, könnte beispielsweise ein zu schwaches Fluoreszenzsignal ein Grund für die fehlende Detektion sein. Insgesamt ist momentan wenig über die zellspezifische und entwicklungsabhängige Expression von Wt1 in XY-Gonaden bekannt.

Für eine detaillierte Analyse wäre es erforderlich, Expressionsanalysen in somatischen Zellen und Keimzellen durchzuführen, die sowohl artübergreifend als auch geschlecht- und entwicklungsspezifisch sein müssten. Die dadurch gewonnenen Resultate könnten wertvolle Anhaltspunkte über bisher unbekannte Funktionen des Wt1-Proteins in der embryonalen und adulten Keimzellreifung geben.

5.2.4 Adamts16 als mögliches Element der Follikulogenese und Vaskulogenese

In der Literatur wurde die *Adamts16*-Expression im adulten Ovar bereits teilweise beschrieben, jedoch lediglich auf Basis von PCR-Experimenten (118, 124). Entgegen der von Gao *et al.* (118) beschriebenen Lokalisation konnten in meiner Arbeit nicht nur die luteinisierten Granulosazellen, sondern gleichermaßen die des Eihügels als Expressionsort identifiziert werden (s. Abb. 12). Zusätzlich beschreiben Gao *et al.* (118), dass FSH die Expression des *Adamts16*-Gens in parietalen Granulosazellen präovulatorischer Follikel stimuliert. Hingegen ist bekannt, dass das Niveau an Wt1 in murinen präovulatorischen Granulosazellen durch eine FSH-Behandlung deutlich reduziert wird (56). In Ovarien junger Ratten hebt FSH z.B. die durch Wt1 ausgelöste Inhibition der Expression des FSH-Rezeptors auf (157). Man geht davon aus, dass Wt1 ein wichtiges Element im hormonell regulierten transkriptionellen Netzwerk reifenden Follikel darstellt. In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass mit steigendem Reifungsgrad der Follikel die Adamts16-Immunfärbungen an Intensität zunahm, der Wt1-Antikörper hingegen zunehmend schwächere Fluoreszenzsignale erbrachte (unveröffentlichte Beobachtung des Autors). Unter Berücksichtigung der bisherigen Versuchsergebnisse und der eigenen Beobachtungen könnte man spekulieren, dass die Regulation des *Adamts16*-Gens durch Wt1 im reifenden Follikel abgeschwächt wird und durch andere Faktoren, wie etwa FSH, ersetzt wird.

Generell könnte eine Wt1-abhängige Regulation der *Adamts16*-Expression in Granulosazellen eine Rolle beim Umbau der EZM spielen, welcher eine Grundvoraussetzung für die Freisetzung der Eizelle im Zuge der Ovulation darstellt. Mehrere Mitglieder der Adamts-Familie konnten bereits mit der Transformation der EZM während der Ovulation assoziiert werden (114, 158, 159). Das Zusammenspiel vieler Proteinasen und anderer Faktoren kann eine redundante Wirkung auf die einzelnen Prozesse haben, die es dem Ovar ermöglichen, auch bei Ausfällen einzelner Faktoren ein funktionelles System aufrechtzuerhalten (159).

Ein weiterer Aspekt bei der Betrachtung der Follikulogenese im Zusammenhang mit Adamts16 ist die Tatsache, dass die Metalloproteinase in der Lage ist α 2-Makroglobulin *in vitro* zu spalten (118). Die Antiproteinase α 2-Makroglobulin wird sowohl von Granulosazellen als auch von Thekazellen produziert (160, 161) und wurde kürzlich als ein regulierendes Element in der Estradiol-Synthese identifiziert (162). Estradiol wird für die Ausbildung dominanter Follikel benötigt. Bisher kann jedoch nur spekuliert werden, ob Adamts16 eventuell ein Teil des Regulationsapparats der Estradiol-Synthese ist. In diesem Zusammenhang müsste überprüft werden, ob α 2-Makroglobulin auch *in vivo* ein Substrat für Adamts16 darstellt und ob beispielsweise ein Adamts16-Knockdown Auswirkungen auf den Estradiolgehalt hat.

Der letzte Diskussionspunkt dieser Arbeit befasst sich mit der Frage nach der Herkunft der follikulären Granulosazellen. Nagetiere und Kaninchen können primordiale Follikel nur kurz nach der Geburt bilden, wohingegen die Ausbildung bei Primaten bereits während der Embryonalentwicklung stattfindet (163). Trotz gewisser Unterschiede sind die wichtigen Schritte der Follikulogenese in der Mehrzahl der Säugetieren sehr ähnlich (164, 165). Bis heute wird speziesunabhängig die Abstammung der primordialen Granulosazellen kontrovers diskutiert. Bisher existieren drei vorherrschende Meinungen bezüglich des Ursprungsortes: 1) mesonephrische Zellen aus dem Rete ovarii (166, 167); 2) Zellen des intragonadalen Blastems (Zentrales Blastem) (168) oder 3) mesotheliale Zellen des Oberflächenepithels der reifenden Gonadenanlage (169). Neuere Untersuchungen an Schaf- und Rinderovarien begünstigen letztere Theorie (170, 171), wobei sich die Bildung der Keimstränge im embryonalen Rinderovar in unmittelbarer Nähe des Oberflächenepithels vollzieht und sich zeitlich mit einer stark erhöhten Proliferationsrate der Epithelzellen deckt. In der Theorie durchlaufen die periovarialen Epithelzellen eine EMT und wandern in den ovariellen Kortex ein. Dort differenzieren sie zu primären Granulosazellen und werden ein Teil der Eiballen. Wt1 konnte bereits in mehreren mesothelialen Geweben als Schlüsselmolekül bei der EMT identifiziert werden. Ein Beispiel ist die Regulation des Adhäsionsproteins E-Cadherin im embryonalen Epikard der Maus (172). In dieser Arbeit wird das Epikard neben dem ovariellen Oberflächenepithel als weiterer Koexpressionsort von Wt1 und Adamts16 identifiziert (Abb. 18). Zusätzlich kann man anhand der Wt1 Vivo-Morpholino-Experimente mit primären murinen Epikardzellen einen regulatorischen Zusammenhang zwischen *Adamts16* und Wt1 annehmen (Abb. 19). Die Koexpression beider Proteine in den epithelialen Geweben lässt vermuten, dass Wt1 dort die Expression der Metalloproteinase beeinflusst und Adamts16 die EMT fördert. Dies

wäre beispielsweise durch Remodellierungen der EZM während der Follikulogenese im Ovar oder der Vaskulogenese im embryonalen Herz möglich.

In diesem Zusammenhang wäre für erste funktionelle Erkenntnisse die weitere Untersuchung der primären Epikardzellen mit und ohne *Adamts16* Vivo-Morpholino-Behandlung auf die Expression von EMT-Markern interessant. Dazu gehören beispielsweise N-Cadherin und Vimentin. Letzteres ist ein Intermediärfilament im Zytoskelett mesenchymaler Zellen wohingegen N-Cadherin ein Adhäsionsmolekül ist. Im Gegensatz zu E-Cadherin fördert N-Cadherin jedoch die Migration bzw. Invasion von Zellen und damit auch die EMT (173, 174). Ein Rückgang von N-Cadherin und Vimentin nach einem *Adamts16*-Knockdown wäre ein deutlicher Hinweis auf eine *Adamts16*-Beteiligung an der EMT.

In ihrer Gesamtheit legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass das *Adamts16*-Gen durch den Wilms-Tumor Transkriptionsfaktor sowohl gewebe- als auch geschlechtsspezifisch reguliert wird. Dieser regulatorische Zusammenhang ist besonders in murinen Nieren und Gonaden ausgeprägt, wobei die funktionelle Relevanz von *Adamts16* in diesen Organen noch näher zu charakterisieren ist. Erste Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit lassen jedoch eine Rolle bei der embryonalen Entwicklung der Niere und der Funktion der Gonaden vermuten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das *ADAMTS16*-Gen kodiert für eine kürzlich identifizierte Metalloproteinase, deren Funktion und Regulation bislang nicht beschrieben sind. Generell werden die ADAMTSs von Zellen verschiedener Organsysteme sezerniert und sind für den Abbau extrazellulärer Matrixbestandteile und die Prozessierung von Oberflächenrezeptoren, Signalmolekülen oder Wachstumsfaktoren verantwortlich. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die Lokalisation von Adamts16 in embryonalen und adulten Geweben als auch mögliche Funktionen der Metalloproteinase im Urogenitalsystem untersucht. Weiterhin konnte die Regulation der *Adamts16*-Expression durch das Wilms-Tumor Protein beschrieben werden, wobei die Wt1(-KTS)-Isoform ein Transkriptionsfaktor in der normalen Embryogenese ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in verschiedenen Zelllinien des Urogenitalsystems eine Wt1-abhängige *Adamts16*-Expression festgestellt werden. Beide Proteine wurden in den glomerulären Podozyten von unreifen und adulten Nieren koexprimiert. Das *Adamts16* mRNA-Niveau konnte durch einen Wt1-Knockdown in embryonalen Nierenkulturen signifikant reduziert werden. Ein Knockdown von Adamts16 in embryonalen Nierenkulturen resultierte in einer deutlichen Reduktion der Zahl der Ureterverästelungen, was eine funktionelle Rolle von Adamts16 in der murinen Nierenentwicklung *ex vivo* andeutet.

Eine Adamts16-Lokalisation konnte auch in den embryonalen und adulten Gonaden nachgewiesen werden. Im embryonalen Testis konnte Adamts16 im Oberflächenepithel und den Keimsträngen lokalisiert werden. Eine Koexpression mit Wt1 trat nur im Oberflächenepithel auf. Im adulten Testis war Adamts16 ohne signifikante Wt1-Koexpression in den Spermatozyten und den elongierten Spermatiden lokalisiert. Das embryonale Ovar zeigte eine Wt1-unabhängig Adamts16-Expression in den Keimzellen, und eine Koexpression beider Proteine in den somatischen Zellen. Im adulten Ovar lag eine Koexpression mit Wt1 in den Granulosazellen aller Follikelstadien und dem ovariellen Oberflächenepithel vor. Der Knockdown von Wt1 in embryonalen Gonadenkulturen zeigte, dass Wt1 in XY-Gonaden (11,5-12,5 d.p.c.) die *Adamts16*-Expression hemmt, in XX-Gonaden (12,5-13,5 d.p.c.) hingegen eine Aktivierung auslöst. Die *Adamts16*-Expression stieg in beiden Geschlechtern zwischen 11,5-13,5 d.p.c. signifikant an, wobei in XX-Gonaden stets mehr *Adamts16* mRNA vorlag als in XY-Gonaden.

Außerhalb des Urogenitalsystems waren *Adamts16* und *Wt1* im Epikard koexprimiert, wobei *Adamts16* auch im Myokard auftrat. Ein *Wt1*-Knockdown in primären Epikardzellen zeigte einen signifikanten Rückgang des *Adamts16*-Expressionsniveaus.

Innerhalb des *Adamts16*-Gens konnten *in silico* drei *Wt1*-Konsensusmotive identifiziert werden. Mit Hilfe von EMSAs und ChIPs konnte die Bindung der *Wt1*(-KTS)-Isoform an diese drei Konsensusmotive sowohl *in vitro* als auch *in vivo* belegt werden. Ein Reporteragenassay zeigte die Aktivierung des *Adamts16*-Promotors durch *Wt1*(-KTS) in humanen Granulosazellen, wobei eine schrittweise Verkürzung der *Adamts16*-Promotor/5'UTR-Sequenz zu einer Reduktion der Promotoraktivität führte.

In ihrer Gesamtheit legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass das *Adamts16*-Gen durch den Wilms-Tumor Transkriptionsfaktor sowohl gewebe- als auch geschlechtsspezifisch reguliert wird. Dieser regulatorische Zusammenhang ist besonders in murinen Nieren und Gonaden ausgeprägt, wobei die funktionelle Relevanz von *Adamts16* in diesen Organen noch näher zu charakterisieren ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen jedoch eine Rolle bei der embryonalen Entwicklung der Niere und der Funktion der Gonaden vermuten.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
AA/BA	Acrylamid-Bisacrylamid
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
ADAMTS	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs
AKI	Adamts16-Antikörper sc-67440
AKII	Adamts16-Antikörper sc-50490
AKIII	Adamts16-Antikörper ab45048
Amhr2	Anti-Müller Hormon Rezeptor 2
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	analysis of variance
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATG	Adenin, Thymin, Guanin
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
Ct	Cycle threshold
CTG	Cytosin, Thymin, Guanin
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
d.p.c.	dies post conceptionem
ds	doppelsträngig
E-Cadherin	endotheliales Cadherin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Egr1	early growth response 1
EMSA	Elektromobilitäts-Shift-Assay
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EZM	extrazelluläre Matrix
Fhl2	four and a half LIM domain protein
FKS	fetales Kälberserum
FOLR3	humane folate receptor 3
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Guanin, Cytosin
GST	Glutathion-S-Transferase
h	human
His	Histidin
HRP	Horseradish peroxidase
HS	high salt
IP	Immunpräzipitation
IVT	<i>in vitro</i> Transkription
kdm5d	lysine (K)-specific demethylase 5D
KTS	Lysin, Threonin, Serin

Abkürzung	Bedeutung
LacZ	β -Galactosidase
LS	low salt
m	Maus
MABT	maleic acid buffer containing Tween
MAK	monoklonaler Antikörper
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
N-Cadherin	neuronaes Cadherin
NK	Negativkontrolle
Nr5a1	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1
NTE	Natrium, Tris, EDTA
NTMT	Natrium, Tris, Magnesiumchlorid, Tween
Ntrk2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
OD	Optische Dichte
PAK	polyklonaler Antikörper
PBND	PCR Buffer with Nonionic Detergents
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
r	Ratte
REN	Restriktionsenzym
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SEM	Standardfehler
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sfl	steroidogenic factor 1
siRNA	small interfering RNA
Sp1	specificity protein 1
Sry	Sex determining region of Y
SSC	saline-sodium citrate
SVMP	Snake Venom Metalloproteinase
TBE	Tris, Borsäure, EDTA
TBST	Tris Buffered Saline with Tween
TC	Thymin, Cytosin
TE	Tris, EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
TGF β	transforming growth factor, beta 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VE-Cadherin	vaskulär-endotheliales Cadherin
Wt1	Wilms tumor 1
Wnt4	wingless-related MMTV integration site 4
XX-Gonade	weiblichen Gonade
XY-Gonade	männlichen Gonade
5'UTR	5' Untranslatierte Region

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Matsunaga E. Genetics of Wilms' tumor. *Hum Genet* 1981;57(3):231-46.
2. Little M, Wells C. A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat* 1997;9(3):209-25.
3. Hastie ND. The genetics of Wilms' tumor--a case of disrupted development. *Annu Rev Genet* 1994;28:523-58.
4. Bremond-Gignac D, Gerard-Blanluet M, Copin H, Bitoun P, Baumann C, Crolla JA, Benzacken B, Verloes A. Three patients with hallucal polydactyly and WAGR syndrome, including discordant expression of Wilms tumor in MZ twins. *Am J Med Genet A* 2005 May 1;134(4):422-5.
5. Breslow NE, Norris R, Norkool PA, Kang T, Beckwith JB, Perlman EJ, Ritchey ML, Green DM, Nichols KE. Characteristics and outcomes of children with the Wilms tumor-Aniridia syndrome: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *J Clin Oncol* 2003 Dec 15;21(24):4579-85.
6. Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG. WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene* 2001 Aug 8;273(2):141-61.
7. Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE, Houghton DC, Junien C, Habib R, Fouser L, . Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 1991 Oct 18;67(2):437-47.
8. Barbaux S, Niaudet P, Gubler MC, Grunfeld JP, Jaubert F, Kuttann F, Fekete CN, Souleyreau-Therville N, Thibaud E, Fellous M, McElreavey K. Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet* 1997 Dec;17(4):467-70.
9. Kikuchi H, Takata A, Akasaka Y, Fukuzawa R, Yoneyama H, Kurosawa Y, Honda M, Kamiyama Y, Hata J. Do intronic mutations affecting splicing of WT1 exon 9 cause Frasier syndrome? *J Med Genet* 1998 Jan;35(1):45-8.
10. Klamt B, Koziell A, Poulat F, Wieacker P, Scambler P, Berta P, Gessler M. Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. *Hum Mol Genet* 1998 Apr;7(4):709-14.
11. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH, . Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 1990 Feb 9;60(3):509-20.
12. Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 1990 Feb 22;343(6260):774-8.

13. Gessler M, Konig A, Moore J, Qualman S, Arden K, Cavenee W, Bruns G. Homozygous inactivation of WT1 in a Wilms' tumor associated with the WAGR syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 1993 Jul;7(3):131-6.
14. Bruening W, Pelletier J. A non-AUG translational initiation event generates novel WT1 isoforms. *J Biol Chem* 1996 Apr 12;271(15):8646-54.
15. Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum Mol Genet* 2006 Oct 15;15 Spec No 2:R196-R201.
16. Reddy JC, Licht JD. The WT1 Wilms' tumor suppressor gene: how much do we really know? *Biochim Biophys Acta* 1996 May 16;1287(1):1-28.
17. Rauscher FJ, III, Morris JF, Tournay OE, Cook DM, Curran T. Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science* 1990 Nov 30;250(4985):1259-62.
18. Ellisen LW, Carlesso N, Cheng T, Scadden DT, Haber DA. The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *EMBO J* 2001 Apr 17;20(8):1897-909.
19. Wang ZY, Qiu QQ, Enger KT, Deuel TF. A second transcriptionally active DNA-binding site for the Wilms tumor gene product, WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Oct 1;90(19):8896-900.
20. Larsson SH, Charlier JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, Cuzin F, Van H, V, Hastie ND. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 1995 May 5;81(3):391-401.
21. Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Nov 1;88(21):9618-22.
22. Bickmore WA, Oghene K, Little MH, Seawright A, Van H, V, Hastie ND. Modulation of DNA binding specificity by alternative splicing of the Wilms tumor wt1 gene transcript. *Science* 1992 Jul 10;257(5067):235-7.
23. Lee SB, Haber DA. Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp Cell Res* 2001 Mar 10;264(1):74-99.
24. Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Glaser T, Housman DE. Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (WT1) during kidney development. *Mol Cell Biol* 1991 Mar;11(3):1707-12.
25. Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Porteous D, Gosden C, Bard J, Buckler A, Pelletier J, Housman D, . The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 1990 Jul 12;346(6280):194-7.
26. Armstrong JF, Pritchard-Jones K, Bickmore WA, Hastie ND, Bard JB. The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev* 1993 Jan;40(1-2):85-97.

27. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993 Aug 27;74(4):679-91.
28. Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A. YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* 1999 May;126(9):1845-57.
29. Herzer U, Crocoll A, Barton D, Howells N, Englert C. The Wilms tumor suppressor gene wt1 is required for development of the spleen. *Curr Biol* 1999 Jul 29;9(15):837-40.
30. Wagner N, Michiels JF, Schedl A, Wagner KD. The Wilms' tumour suppressor WT1 is involved in endothelial cell proliferation and migration: expression in tumour vessels in vivo. *Oncogene* 2008 Jun 12;27(26):3662-72.
31. Chau YY, Hastie ND. The role of Wt1 in regulating mesenchyme in cancer, development, and tissue homeostasis. *Trends Genet* 2012 Oct;28(10):515-24.
32. Kleinebrecht J, Selow J, Winkler W. The mouse mutant limb-deformity (ld). *Anat Anz* 1982;152(4):313-24.
33. Chau YY, Brownstein D, Mjoseng H, Lee WC, Buza-Vidas N, Nerlov C, Jacobsen SE, Perry P, Berry R, Thornburn A, Sexton D, Morton N, Hohenstein P, Freyer E, Samuel K, van't HR, Hastie N. Acute multiple organ failure in adult mice deleted for the developmental regulator Wt1. *PLoS Genet* 2011 Dec;7(12):e1002404.
34. Saxen L, Sariola H, Lehtonen E. Sequential cell and tissue interactions governing organogenesis of the kidney. *Anat Embryol (Berl)* 1986;175(1):1-6.
35. Poole TJ, Steinberg MS. Amphibian pronephric duct morphogenesis: segregation, cell rearrangement and directed migration of the Ambystoma duct rudiment. *J Embryol Exp Morphol* 1981 Jun;63:1-16.
36. Poole TJ, Steinberg MS. Evidence for the guidance of pronephric duct migration by a craniocaudally traveling adhesion gradient. *Dev Biol* 1982 Jul;92(1):144-58.
37. Grobstein C. Morphogenetic interaction between embryonic mouse tissues separated by a membrane filter. *Nature* 1953 Nov 7;172(4384):869-70.
38. Davies JA, Lodomery M, Hohenstein P, Michael L, Shafe A, Spraggon L, Hastie N. Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the Wt1 tumour suppressor is required for nephron differentiation. *Hum Mol Genet* 2004 Jan 15;13(2):235-46.
39. Essafi A, Webb A, Berry RL, Slight J, Burn SF, Spraggon L, Velecela V, Martinez-Estrada OM, Wiltshire JH, Roberts SG, Brownstein D, Davies JA, Hastie ND, Hohenstein P. A wt1-controlled chromatin switching mechanism underpins tissue-specific wnt4 activation and repression. *Dev Cell* 2011 Sep 13;21(3):559-74.
40. Sim EU, Smith A, Szilagi E, Rae F, Ioannou P, Lindsay MH, Little MH. Wnt-4 regulation by the Wilms' tumour suppressor gene, WT1. *Oncogene* 2002 May 2;21(19):2948-60.

41. Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 1994 Dec 15;372(6507):679-83.
42. Lee SB, Huang K, Palmer R, Truong VB, Herzlinger D, Kolquist KA, Wong J, Paulding C, Yoon SK, Gerald W, Oliner JD, Haber DA. The Wilms tumor suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulin. *Cell* 1999 Sep 3;98(5):663-73.
43. Uhlenhaut NH, Treier M. Transcriptional regulators in kidney disease: gatekeepers of renal homeostasis. *Trends Genet* 2008 Jul;24(7):361-71.
44. Mundlos S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A, Zabel B. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* 1993 Dec;119(4):1329-41.
45. Guo JK, Menke AL, Gubler MC, Clarke AR, Harrison D, Hammes A, Hastie ND, Schedl A. WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Hum Mol Genet* 2002 Mar 15;11(6):651-9.
46. Schedl A, Hastie N. Multiple roles for the Wilms' tumour suppressor gene, WT1 in genitourinary development. *Mol Cell Endocrinol* 1998 May 25;140(1-2):65-9.
47. Hanley NA, Ball SG, Clement-Jones M, Hagan DM, Strachan T, Lindsay S, Robson S, Ostrer H, Parker KL, Wilson DI. Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mech Dev* 1999 Sep;87(1-2):175-80.
48. Hossain A, Saunders GF. The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Biol Chem* 2001 May 18;276(20):16817-23.
49. Byskov AG. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev* 1986 Jan;66(1):71-117.
50. Natoli TA, Alberta JA, Bortvin A, Taglienti ME, Menke DB, Loring J, Jaenisch R, Page DC, Housman DE, Kreidberg JA. Wt1 functions in the development of germ cells in addition to somatic cell lineages of the testis. *Dev Biol* 2004 Apr 15;268(2):429-40.
51. Shima JE, McLean DJ, McCarrey JR, Griswold MD. The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. *Biol Reprod* 2004 Jul;71(1):319-30.
52. Pelletier J, Schalling M, Buckler AJ, Rogers A, Haber DA, Housman D. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev* 1991 Aug;5(8):1345-56.
53. Rao MK, Pham J, Imam JS, MacLean JA, Murali D, Furuta Y, Sinha-Hikim AP, Wilkinson MF. Tissue-specific RNAi reveals that WT1 expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis. *Genes Dev* 2006 Jan 15;20(2):147-52.

54. Hawkins SM, Matzuk MM. The menstrual cycle: basic biology. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1135:10-8.
55. Hsu SY, Kubo M, Chun SY, Haluska FG, Housman DE, Hsueh AJ. Wilms' tumor protein WT1 as an ovarian transcription factor: decreases in expression during follicle development and repression of inhibin-alpha gene promoter. *Mol Endocrinol* 1995 Oct;9(10):1356-66.
56. Roh J, Bae J, Lee K, Mayo K, Shea L, Woodruff TK. Regulation of Wilms' tumor gene expression by nerve growth factor and follicle-stimulating hormone in the immature mouse ovary. *Fertil Steril* 2009 Apr;91(4 Suppl):1451-4.
57. Shimamura R, Fraizer GC, Trapman J, Lau Y, Saunders GF. The Wilms' tumor gene WT1 can regulate genes involved in sex determination and differentiation: SRY, Mullerian-inhibiting substance, and the androgen receptor. *Clin Cancer Res* 1997 Dec;3(12 Pt 2):2571-80.
58. Cal S, Obaya AJ, Llamazares M, Garabaya C, Quesada V, Lopez-Otin C. Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene* 2002 Jan 23;283(1-2):49-62.
59. Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of metalloproteinases. *Methods Enzymol* 1995;248:183-228.
60. Bode W, Reinemer P, Huber R, Kleine T, Schnierer S, Tschesche H. The X-ray crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase inhibited by a substrate analogue reveals the essentials for catalysis and specificity. *EMBO J* 1994 Mar 15;13(6):1263-9.
61. Sopata I, Wize J. A latent gelatin specific proteinase of human leucocytes and its activation. *Biochim Biophys Acta* 1979 Dec 7;571(2):305-12.
62. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 2003 Jul;200(4):448-64.
63. Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997 Oct;6(5):199-213.
64. Johansson N, Airola K, Grenman R, Kariniemi AL, Saarialho-Kere U, Kahari VM. Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Am J Pathol* 1997 Aug;151(2):499-508.
65. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990 Apr;6(4):121-5.
66. Marchenko GN, Marchenko ND, Strongin AY. The structure and regulation of the human and mouse matrix metalloproteinase-21 gene and protein. *Biochem J* 2003 Jun 1;372(Pt 2):503-15.
67. Uitto VJ, Airola K, Vaalamo M, Johansson N, Putnins EE, Firth JD, Salonen J, Lopez-Otin C, Saarialho-Kere U, Kahari VM. Collagenase-3 (matrix

- metalloproteinase-13) expression is induced in oral mucosal epithelium during chronic inflammation. *Am J Pathol* 1998 Jun;152(6):1489-99.
68. Lindy O, Konttinen YT, Sorsa T, Ding Y, Santavirta S, Ceponis A, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) in human rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1997 Aug;40(8):1391-9.
 69. Keyszer G, Lambiri I, Keysser M, Keysser C, Nagel R, Burmester GR, Jung K. Matrix metalloproteinases, but not cathepsins B, H, and L or their inhibitors in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis are potentially useful markers of disease activity. *Z Rheumatol* 1998 Dec;57(6):392-8.
 70. Gijbels K, Masure S, Carton H, Opdenakker G. Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders. *J Neuroimmunol* 1992 Nov;41(1):29-34.
 71. Lichtinghagen R, Breitenstein K, Arndt B, Kuhbacher T, Boker KH. Comparison of matrix metalloproteinase expression in normal and cirrhotic human liver. *Virchows Arch* 1998 Feb;432(2):153-8.
 72. Marcet-Palacios M, Ulanova M, Duta F, Puttagunta L, Munoz S, Gibbings D, Radomski M, Cameron L, Mayers I, Befus AD. The transcription factor Wilms tumor 1 regulates matrix metalloproteinase-9 through a nitric oxide-mediated pathway. *J Immunol* 2007 Jul 1;179(1):256-65.
 73. Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 1992 Mar 19;356(6366):248-52.
 74. Wolfsberg TG, Straight PD, Gerena RL, Huovila AP, Primakoff P, Myles DG, White JM. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev Biol* 1995 May;169(1):378-83.
 75. Huxley-Jones J, Clarke TK, Beck C, Toubaris G, Robertson DL, Boot-Handford RP. The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC Evol Biol* 2007;7:63.
 76. Puente XS, Lopez-Otin C. A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors. *Genome Res* 2004 Apr;14(4):609-22.
 77. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 2008 Oct;29(5):258-89.
 78. Huovila AP, Turner AJ, Peltto-Huikko M, Karkkainen I, Ortiz RM. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci* 2005 Jul;30(7):413-22.
 79. Yamamoto S, Higuchi Y, Yoshiyama K, Shimizu E, Kataoka M, Hijiya N, Matsuura K. ADAM family proteins in the immune system. *Immunol Today* 1999 Jun;20(6):278-84.
 80. Primakoff P, Myles DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* 2000 Feb;16(2):83-7.

81. Primakoff P, Myles DG. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* 2002 Jun 21;296(5576):2183-5.
82. Yamaguchi R, Muro Y, Isotani A, Tokuhiko K, Takumi K, Adham I, Ikawa M, Okabe M. Disruption of ADAM3 impairs the migration of sperm into oviduct in mouse. *Biol Reprod* 2009 Jul;81(1):142-6.
83. Gomez-Gavira M, Dominguez-Luis M, Canchado J, Calafat J, Janssen H, Lara-Pezzi E, Fourie A, Tugores A, Valenzuela-Fernandez A, Mollinedo F, Sanchez-Madrid F, az-Gonzalez F. Expression and regulation of the metalloproteinase ADAM-8 during human neutrophil pathophysiological activation and its catalytic activity on L-selectin shedding. *J Immunol* 2007 Jun 15;178(12):8053-63.
84. Bernstein HG, Bukowska A, Krell D, Bogerts B, Ansorge S, Lendeckel U. Comparative localization of ADAMs 10 and 15 in human cerebral cortex normal aging, Alzheimer disease and Down syndrome. *J Neurocytol* 2003 Feb;32(2):153-60.
85. Weskamp G, Ford JW, Sturgill J, Martin S, Docherty AJ, Swendeman S, Broadway N, Hartmann D, Saftig P, Umland S, Sehara-Fujisawa A, Black RA, Ludwig A, Becherer JD, Conrad DH, Blobel CP. ADAM10 is a principal 'shedase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23. *Nat Immunol* 2006 Dec;7(12):1293-8.
86. Plumb J, McQuaid S, Cross AK, Surr J, Haddock G, Bunning RA, Woodroffe MN. Upregulation of ADAM-17 expression in active lesions in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2006 Aug;12(4):375-85.
87. Worley JR, Hughes DA, Dozio N, Gavrilovic J, Sampson MJ. Low density lipoprotein from patients with Type 2 diabetes increases expression of monocyte matrix metalloproteinase and ADAM metalloproteinase genes. *Cardiovasc Diabetol* 2007;6:21.
88. Van EP, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, Torrey D, Pandit S, McKenny J, Braunschweiger K, Walsh A, Liu Z, Hayward B, Folz C, Manning SP, Bawa A, Saracino L, Thackston M, Benchekroun Y, Capparell N, Wang M, Adair R, Feng Y, Dubois J, FitzGerald MG, Huang H, Gibson R, Allen KM, Pedan A, Danzig MR, Umland SP, Egan RW, Cuss FM, Rorke S, Clough JB, Holloway JW, Holgate ST, Keith TP. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 2002 Jul 25;418(6896):426-30.
89. Valkovskaya N, Kaye H, Felix K, Hartmann D, Giese NA, Osinsky SP, Friess H, Kleeff J. ADAM8 expression is associated with increased invasiveness and reduced patient survival in pancreatic cancer. *J Cell Mol Med* 2007 Sep;11(5):1162-74.
90. O'Shea C, McKie N, Buggy Y, Duggan C, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ. Expression of ADAM-9 mRNA and protein in human breast cancer. *Int J Cancer* 2003 Jul 20;105(6):754-61.
91. Kveiborg M, Frohlich C, Albrechtsen R, Tischler V, Dietrich N, Holck P, Kronqvist P, Rank F, Mercurio AM, Wewer UM. A role for ADAM12 in breast tumor progression and stromal cell apoptosis. *Cancer Res* 2005 Jun 1;65(11):4754-61.

92. Mazzocca A, Coppari R, De FR, Cho JY, Libermann TA, Pinzani M, Toker A. A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor-stromal interactions. *Cancer Res* 2005 Jun 1;65(11):4728-38.
93. McCulloch DR, Harvey M, Herington AC. The expression of the ADAMs proteases in prostate cancer cell lines and their regulation by dihydrotestosterone. *Mol Cell Endocrinol* 2000 Sep 25;167(1-2):11-21.
94. Bech-Serra JJ, Santiago-Josefat B, Esselens C, Saftig P, Baselga J, Arribas J, Canals F. Proteomic identification of desmoglein 2 and activated leukocyte cell adhesion molecule as substrates of ADAM17 and ADAM10 by difference gel electrophoresis. *Mol Cell Biol* 2006 Jul;26(13):5086-95.
95. Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, de SB, Hartmann D, Saftig P. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Jun 28;102(26):9182-7.
96. Reiss K, Maretzky T, Ludwig A, Tousseyn T, de SB, Hartmann D, Saftig P. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J* 2005 Feb 23;24(4):742-52.
97. Schulz B, Pruessmeyer J, Maretzky T, Ludwig A, Blobel CP, Saftig P, Reiss K. ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ Res* 2008 May 23;102(10):1192-201.
98. Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem* 1997 Jan 3;272(1):556-62.
99. Llamazares M, Cal S, Quesada V, Lopez-Otin C. Identification and characterization of ADAMTS-20 defines a novel subfamily of metalloproteinases-disintegrins with multiple thrombospondin-1 repeats and a unique GON domain. *J Biol Chem* 2003 Apr 11;278(15):13382-9.
100. Somerville RP, Longpre JM, Jungers KA, Engle JM, Ross M, Evanko S, Wight TN, Leduc R, Apte SS. Characterization of ADAMTS-9 and ADAMTS-20 as a distinct ADAMTS subfamily related to *Caenorhabditis elegans* GON-1. *J Biol Chem* 2003 Mar 14;278(11):9503-13.
101. Cal S, Arguelles JM, Fernandez PL, Lopez-Otin C. Identification, characterization, and intracellular processing of ADAM-TS12, a novel human disintegrin with a complex structural organization involving multiple thrombospondin-1 repeats. *J Biol Chem* 2001 May 25;276(21):17932-40.
102. Tortorella MD, Burn TC, Pratta MA, Abbaszade I, Hollis JM, Liu R, Rosenfeld SA, Copeland RA, Decicco CP, Wynn R, Rockwell A, Yang F, Duke JL, Solomon K, George H, Bruckner R, Nagase H, Itoh Y, Ellis DM, Ross H, Wiswall BH, Murphy K, Hillman MC, Jr., Hollis GF, Newton RC, Magolda RL, Trzaskos JM, Arner EC. Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science* 1999 Jun 4;284(5420):1664-6.

103. Cao J, Hymowitz M, Conner C, Bahou WF, Zucker S. The propeptide domain of membrane type 1-matrix metalloproteinase acts as an intramolecular chaperone when expressed in trans with the mature sequence in COS-1 cells. *J Biol Chem* 2000 Sep 22;275(38):29648-53.
104. Milla ME, Leesnitzer MA, Moss ML, Clay WC, Carter HL, Miller AB, Su JL, Lambert MH, Willard DH, Sheeley DM, Kost TA, Burkhart W, Moyer M, Blackburn RK, Pahel GL, Mitchell JL, Hoffman CR, Becherer JD. Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE). *J Biol Chem* 1999 Oct 22;274(43):30563-70.
105. Bergeron F, Leduc R, Day R. Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications. *J Mol Endocrinol* 2000 Feb;24(1):1-22.
106. Tang BL. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int J Biochem Cell Biol* 2001 Jan;33(1):33-44.
107. Kuno K, Matsushima K. ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *J Biol Chem* 1998 May 29;273(22):13912-7.
108. Fernandes RJ, Hirohata S, Engle JM, Colige A, Cohn DH, Eyre DR, Apte SS. Procollagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3. Insights on dermatosparaxis. *J Biol Chem* 2001 Aug 24;276(34):31502-9.
109. Colige A, Beschin A, Samyn B, Goebels Y, Van BJ, Nusgens BV, Lapiere CM. Characterization and partial amino acid sequencing of a 107-kDa procollagen I N-proteinase purified by affinity chromatography on immobilized type XIV collagen. *J Biol Chem* 1995 Jul 14;270(28):16724-30.
110. Vazquez F, Hastings G, Ortega MA, Lane TF, Oikemus S, Lombardo M, Iruela-Arispe ML. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J Biol Chem* 1999 Aug 13;274(33):23349-57.
111. Hyun J, Kim HK, Kim JE, Lim MG, Jung JS, Park S, Cho HI. Correlation between plasma activity of ADAMTS-13 and coagulopathy, and prognosis in disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res* 2009 May;124(1):75-9.
112. Hurskainen TL, Hirohata S, Seldin MF, Apte SS. ADAM-TS5, ADAM-TS6, and ADAM-TS7, novel members of a new family of zinc metalloproteases. General features and genomic distribution of the ADAM-TS family. *J Biol Chem* 1999 Sep 3;274(36):25555-63.
113. Kim J, Kim H, Lee SJ, Choi YM, Lee SJ, Lee JY. Abundance of ADAM-8, -9, -10, -12, -15 and -17 and ADAMTS-1 in mouse uterus during the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* 2005;17(5):543-55.
114. Madan P, Bridges PJ, Komar CM, Beristain AG, Rajamahendran R, Fortune JE, MacCalman CD. Expression of messenger RNA for ADAMTS subtypes changes in

- the periovulatory follicle after the gonadotropin surge and during luteal development and regression in cattle. *Biol Reprod* 2003 Nov;69(5):1506-14.
115. Brown HM, Dunning KR, Robker RL, Pritchard M, Russell DL. Requirement for ADAMTS-1 in extracellular matrix remodeling during ovarian folliculogenesis and lymphangiogenesis. *Dev Biol* 2006 Dec 15;300(2):699-709.
 116. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, Yang AY, Siemieniak DR, Stark KR, Gruppo R, Sarode R, Shurin SB, Chandrasekaran V, Stabler SP, Sabio H, Bouhassira EE, Upshaw JD, Jr., Ginsburg D, Tsai HM. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001 Oct 4;413(6855):488-94.
 117. Turner SL, Blair-Zajdel ME, Bunning RA. ADAMs and ADAMTSs in cancer. *Br J Biomed Sci* 2009;66(2):117-28.
 118. Gao S, De GC, Kossowska K, Zhang H. FSH stimulates the expression of the ADAMTS-16 protease in mature human ovarian follicles. *Mol Hum Reprod* 2007 Jul;13(7):465-71.
 119. Sakamoto N, Oue N, Noguchi T, Sentani K, Anami K, Sanada Y, Yoshida K, Yasui W. Serial analysis of gene expression of esophageal squamous cell carcinoma: ADAMTS16 is upregulated in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2010 Apr;101(4):1038-44.
 120. Davidson RK, Waters JG, Kevorkian L, Darrah C, Cooper A, Donell ST, Clark IM. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage. *Arthritis Res Ther* 2006;8(4):R124.
 121. Kevorkian L, Young DA, Darrah C, Donell ST, Shepstone L, Porter S, Brockbank SM, Edwards DR, Parker AE, Clark IM. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum* 2004 Jan;50(1):131-41.
 122. Johnston P, Larson D, Clark IM, Chojnowski AJ. Metalloproteinase gene expression correlates with clinical outcome in Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am* 2008 Sep;33(7):1160-7.
 123. Joe B, Saad Y, Lee NH, Frank BC, Achinike OH, Luu TV, Gopalakrishnan K, Toland EJ, Farms P, Yerga-Woolwine S, Manickavasagam E, Rapp JP, Garrett MR, Coe D, Apte SS, Rankinen T, Perusse L, Ehret GB, Ganesh SK, Cooper RS, O'Connor A, Rice T, Weder AB, Chakravarti A, Rao DC, Bouchard C. Positional identification of variants of Adamts16 linked to inherited hypertension. *Hum Mol Genet* 2009 Aug 1;18(15):2825-38.
 124. Surridge AK, Rodgers UR, Swingler TE, Davidson RK, Kevorkian L, Norton R, Waters JG, Goldring MB, Parker AE, Clark IM. Characterization and regulation of ADAMTS-16. *Matrix Biol* 2009 Sep;28(7):416-24.
 125. Zeng W, Corcoran C, Collins-Racie LA, Lavallie ER, Morris EA, Flannery CR. Glycosaminoglycan-binding properties and aggrecanase activities of truncated ADAMTSs: comparative analyses with ADAMTS-5, -9, -16 and -18. *Biochim Biophys Acta* 2006 Mar;1760(3):517-24.

126. Boeuf S, Graf F, Fischer J, Moradi B, Little CB, Richter W. Regulation of aggrecanases from the ADAMTS family and aggrecan neoepitope formation during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 2012;23:320-32.
127. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977 Jul;36(1):59-74.
128. van den Berg-Bakker CA, Hagemeijer A, Franken-Postma EM, Smit VT, Kuppen PJ, van Ravenswaay Claassen HH, Cornelisse CJ, Schrier PI. Establishment and characterization of 7 ovarian carcinoma cell lines and one granulosa tumor cell line: growth features and cytogenetics. *Int J Cancer* 1993 Feb 20;53(4):613-20.
129. Englert C, Hou X, Maheswaran S, Bennett P, Ngwu C, Re GG, Garvin AJ, Rosner MR, Haber DA. WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *EMBO J* 1995 Oct 2;14(19):4662-75.
130. Hartwig S, Ho J, Pandey P, Macisaac K, Taglienti M, Xiang M, Alterovitz G, Ramoni M, Fraenkel E, Kreidberg JA. Genomic characterization of Wilms' tumor suppressor 1 targets in nephron progenitor cells during kidney development. *Development* 2010 Apr;137(7):1189-203.
131. Wagner N, Wagner KD, Theres H, Englert C, Schedl A, Scholz H. Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1. *Genes Dev* 2005 Nov 1;19(21):2631-42.
132. Achtstatter T, Moll R, Moore B, Franke WW. Cytokeratin polypeptide patterns of different epithelia of the human male urogenital tract: immunofluorescence and gel electrophoretic studies. *J Histochem Cytochem* 1985 May;33(5):415-26.
133. Farrell MJ, Kirby ML. Cell biology of cardiac development. *Int Rev Cytol* 2001;202:99-158.
134. Hamilton TB, Barilla KC, Romaniuk PJ. High affinity binding sites for the Wilms' tumour suppressor protein WT1. *Nucleic Acids Res* 1995 Jan 25;23(2):277-84.
135. Drummond IA, Rupprecht HD, Rohwer-Nutter P, Lopez-Guisa JM, Madden SL, Rauscher FJ, III, Sukhatme VP. DNA recognition by splicing variants of the Wilms' tumor suppressor, WT1. *Mol Cell Biol* 1994 Jun;14(6):3800-9.
136. Nakagama H, Heinrich G, Pelletier J, Housman DE. Sequence and structural requirements for high-affinity DNA binding by the WT1 gene product. *Mol Cell Biol* 1995 Mar;15(3):1489-98.
137. Klattig J, Sierig R, Kruspe D, Besenbeck B, Englert C. Wilms' tumor protein Wt1 is an activator of the anti-Mullerian hormone receptor gene Amhr2. *Mol Cell Biol* 2007 Jun;27(12):4355-64.
138. Tan RJ, Liu Y. Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012 Jun 1;302(11):F1351-F1361.

139. Haas CS, Gleason B, Lin S, Tramonti G, Kanwar YS. Matrix metalloproteinases in renal development. *Connect Tissue Res* 2004;45(2):73-85.
140. Arnould C, Lelievre-Pegorier M, Ronco P, Lelongt B. MMP9 limits apoptosis and stimulates branching morphogenesis during kidney development. *J Am Soc Nephrol* 2009 Oct;20(10):2171-80.
141. Stuart RO, Bush KT, Nigam SK. Changes in gene expression patterns in the ureteric bud and metanephric mesenchyme in models of kidney development. *Kidney Int* 2003 Dec;64(6):1997-2008.
142. Rudnicki M, Perco P, Neuwirt H, Noppert SJ, Leierer J, Sunzenauer J, Eder S, Zoja C, Eller K, Rosenkranz AR, Muller GA, Mayer B, Mayer G. Increased renal versican expression is associated with progression of chronic kidney disease. *PLoS One* 2012;7(9):e44891.
143. Mittaz L, Russell DL, Wilson T, Brasted M, Tkalcevic J, Salamonsen LA, Hertzog PJ, Pritchard MA. Adamts-1 is essential for the development and function of the urogenital system. *Biol Reprod* 2004 Apr;70(4):1096-105.
144. Jungers KA, Le GC, Somerville RP, Apte SS. Adamts9 is widely expressed during mouse embryo development. *Gene Expr Patterns* 2005 Jun;5(5):609-17.
145. Gopalakrishnan K, Kumarasamy S, Abdul-Majeed S, Kalinoski AL, Morgan EE, Gohara AF, Nauli SM, Filipiak WE, Saunders TL, Joe B. Targeted disruption of Adamts16 gene in a rat genetic model of hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012 Dec 11;109(50):20555-9.
146. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991 Mar 22;251(5000):1451-5.
147. Birchmeier W, Hulsken J, Behrens J. E-cadherin as an invasion suppressor. *Ciba Found Symp* 1995;189:124-36.
148. Kelley KM, Wang H, Ratnam M. Dual regulation of ets-activated gene expression by SP1. *Gene* 2003 Mar 27;307:87-97.
149. Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA. Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* 1998 May 1;93(3):445-54.
150. Groma G, Grskovic I, Schael S, Ehlen HW, Wagener R, Fosang A, Aszodi A, Paulsson M, Brachvogel B, Zaucke F. Matrilin-4 is processed by ADAMTS-5 in late Golgi vesicles present in growth plate chondrocytes of defined differentiation state. *Matrix Biol* 2011 May;30(4):275-80.
151. Klatt AR, Nitsche DP, Kobbe B, Macht M, Paulsson M, Wagener R. Molecular structure, processing, and tissue distribution of matrilin-4. *J Biol Chem* 2001 May 18;276(20):17267-75.
152. Zhu GZ, Lin Y, Myles DG, Primakoff P. Identification of four novel ADAMs with potential roles in spermatogenesis and fertilization. *Gene* 1999 Jul 8;234(2):227-37.

153. Han C, Kwon JT, Park I, Lee B, Jin S, Choi H, Cho C. Impaired sperm aggregation in Adam2 and Adam3 null mice. *Fertil Steril* 2010 May 15;93(8):2754-6.
154. Yao PL, Lin YC, Richburg JH. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) promotes invasion and migration of human testicular embryonal carcinoma cells. *Biol Reprod* 2012 May;86(5):160, 1-160,10.
155. Gao F, Maiti S, Alam N, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, Lecureuil C, Guillou F, Huff V. The Wilms tumor gene, Wt1, is required for Sox9 expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Aug 8;103(32):11987-92.
156. Pask AJ, Paplinska JZ, Shaw G, Graves JA, Renfree MB. Marsupial WT1 has a novel isoform and is expressed in both somatic and germ cells in the developing ovary and testis. *Sex Dev* 2007;1(3):169-80.
157. Yoon O, Roh J. Regulation of FSH receptor expression by the Wilms' tumor 1 gene product (WT1) in immature rat granulosa cells. *Mol Reprod Dev* 2012 Jun;79(6):368.
158. Shozu M, Minami N, Yokoyama H, Inoue M, Kurihara H, Matsushima K, Kuno K. ADAMTS-1 is involved in normal follicular development, ovulatory process and organization of the medullary vascular network in the ovary. *J Mol Endocrinol* 2005 Oct;35(2):343-55.
159. Richards JS, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Teuling E, Lo Y, Boerboom D, Falender AE, Doyle KH, LeBaron RG, Thompson V, Sandy JD. Regulated expression of ADAMTS family members in follicles and cumulus oocyte complexes: evidence for specific and redundant patterns during ovulation. *Biol Reprod* 2005 May;72(5):1241-55.
160. Gaddy-Kurten D, Hickey GJ, Fey GH, Gauldie J, Richards JS. Hormonal regulation and tissue-specific localization of alpha 2-macroglobulin in rat ovarian follicles and corpora lutea. *Endocrinology* 1989 Dec;125(6):2985-95.
161. Gaddy-Kurten D, Richards JS. Regulation of alpha 2-macroglobulin by luteinizing hormone and prolactin during cell differentiation in the rat ovary. *Mol Endocrinol* 1991 Sep;5(9):1280-91.
162. Ireland JL, Jimenez-Krassel F, Winn ME, Burns DS, Ireland JJ. Evidence for autocrine or paracrine roles of alpha2-macroglobulin in regulation of estradiol production by granulosa cells and development of dominant follicles. *Endocrinology* 2004 Jun;145(6):2784-94.
163. Fortune JE, Yang MY, Muruvi W. The earliest stages of follicular development: follicle formation and activation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2010;67:203-16.
164. Dubois M, Mauleon P. [Demonstration by immunofluorescence of cells with LH gonadotropic activity in lamb fetus hypophysis]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1969 Jul 16;269(2):219-22.

165. Russe I, Sinowatz F, Richter L, Lehmann M, Schallenberger E. [The development of the yolk sac in ruminants (sheep and cattle)]. *Anat Histol Embryol* 1992 Dec;21(4):324-47.
166. Byskov AG, Lintern-Moore S. Follicle formation in the immature mouse ovary: the role of the rete ovarii. *J Anat* 1973 Nov;116(Pt 2):207-17.
167. Byskov AG. The role of the rete ovarii in meiosis and follicle formation in the cat, mink and ferret. *J Reprod Fertil* 1975 Nov;45(2):201-9.
168. Hirshfield AN. Heterogeneity of cell populations that contribute to the formation of primordial follicles in rats. *Biol Reprod* 1992 Sep;47(3):466-72.
169. Gondos B. Surface epithelium of the developing ovary. Possible correlation with ovarian neoplasia. *Am J Pathol* 1975 Nov;81(2):303-21.
170. Sawyer HR, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ, McNatty KP. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol Reprod* 2002 Apr;66(4):1134-50.
171. Kenngott RA, Vermehren M, Ebach K, Sinowatz F. The role of ovarian surface epithelium in folliculogenesis during fetal development of the bovine ovary: a histological and immunohistochemical study. *Sex Dev* 2013;7(4):180-95.
172. Martinez-Estrada OM, Lettice LA, Essafi A, Guadix JA, Slight J, Velecela V, Hall E, Reichmann J, Devenney PS, Hohenstein P, Hosen N, Hill RE, Munoz-Chapuli R, Hastie ND. Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat Genet* 2010 Jan;42(1):89-93.
173. Savagner P. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Ann Oncol* 2010 Oct;21 Suppl 7:vii89-vii92.
174. Tran NL, Nagle RB, Cress AE, Heimark RL. N-Cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines. An epithelial-mesenchymal transformation mediating adhesion with Stromal cells. *Am J Pathol* 1999 Sep;155(3):787-98.

9 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Holger Scholz für die Bereitschaft, mich in seiner Arbeitsgruppe Zelluläre Entwicklungsphysiologie und Pathophysiologie am Institut für Vegetative Physiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin aufzunehmen, für die Bereitstellung eines interessanten Themas und eines Arbeitsplatzes, für die hilfreichen Diskussionen und kleinen Tipps sowie für die Begutachtung meiner Dissertation bedanken.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Karin Kirschner für ihre unermüdliche Bereitschaft mit Wort und Tat zu helfen, für ihre besondere Art stets mit einem offenen Ohr zuzuhören und mit viel Ausdauer und Geduld zu diskutieren und zu erklären, für ihre konstruktiven Kritiken und für die schöne Zusammenarbeit. Eine bessere Betreuung hätte ich nicht bekommen können. In gleicher Weise geht meine Dank auch an Dr. Anja Bondke Persson und Dr. Lina Sciesielski. Beide haben mir stets mit Rat und Tat zu Seite gestanden und waren einfach tolle Kolleginnen. Danke, Lina für die Starthilfe und Anja für den Endspurt.

Natürlich möchte ich mich auch bei allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts und der AG Scholz bedanken, besonders bei Frau Inge Grätsch, Frau Angelika Richter und Frau Ulrike Neumann. Alle drei haben mir mit ihrer Hilfe das Arbeiten erleichtert, und jede hat auf ihre ganz individuelle Art Spaß und Freude in meinen (Arbeits-)Alltag gebracht.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden für ihr Verständnis, ihre Ausdauer und das große Interesse an meiner Arbeit (auch wenn ich das nicht immer wie gewünscht befriedigen konnte). Danke Benni; danke Corinna und Arsène; danke Simone, Kathi und Julian.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Kloetzel, Prof. Dr. Saumweber, Prof. Dr. Lockau und Prof. Dr. Schmitz-Linneweber für die Begutachtung meiner Arbeit bzw. für die Bereitschaft, Teil meiner Promotionskommission zu sein. Mein Dank geht auch an die Sonnenfeld- und die FAZIT-Stiftung, die mich beide während meiner Promotion finanziell unterstützt haben.

Last but not least, danke Frau Weidmann.

10 PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen

- 05/2013 **Jacobi CLJ**, Rudigier LJ, Scholz H, Kirschner KM “Transcriptional regulation by the Wilms tumor protein, Wt1, suggests a role of the metalloproteinase Adamts16 in murine genitourinary development. *J Biol Chem* 2013;288(26):18811-24.
- 03/2012 Depping R, Schindler SG, **Jacobi C**, Kirschner KM, Scholz H. “Nuclear transport of Wilms' tumour protein Wt1 involves importins alpha and beta.“ *Cell Physiol Biochem* 2012;29(1-2):223-32.

Kongressbeiträge

- 03/2013 **Jacobi CLJ**, Rudigier LJ, Scholz H, Kirschner K „ADAMTS16: A novel metalloproteinase involved in kidney development“, *Acta Physiologica* 2013; Volume 207, Supplement 694
- 03/2012 Depping R, Schindler SG, **Jacobi C**, Kirschner KM, Scholz H „ Nuclear transport of Wilms tumor protein Wt1 involves importins α and β “, *Acta Physiologica* 2012; Volume 204, Supplement 689
- 03/2011 **Jacobi CLJ**, Kirschner K, Scholz H „The wilms tumor transcription factor, Wt1, stimulates expression of the *adamts16* gene“, *Acta Physiologica* 2011; Volume 201, Supplement 682
- 03/2011 Braun J, **Jacobi CLJ**, Scholz H, Kirschner K „Wilms tumor suppressor stimulates expression of the gene encoding amiloride-binding protein 1“, *Acta Physiologica* 2011; Volume 201, Supplement 682
- 03/2010 **Jacobi CLJ**, Kirschner KM, Scholz H “Expression control of the ADAMTS16 gene by the Wilms tumor transcription factor, WT1, in the developing kidneys and gonads“, *Acta Physiologica* 2010; Volume 198, Supplement 677

11 EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Charlotte Jacobi, dass ich die vorgelegte Dissertation zum Thema: „Regulation und Funktion der Metalloproteinase Adamts16 während der Entwicklung von Urogenitalsystem und Epikard“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die vorliegende Dissertation wurde ohne Hilfe Dritter verfasst und ist nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens gewesen.

Ort/Datum

Charlotte Jacobi